

Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Nutriční specialista



**Petra Michková**

**Změny mikrobiálního osídlení trávicího traktu u pacientů po alogenní  
transplantaci hematopoetických buněk**

**Changes in microbial colonization of gastrointestinal tract in patients after  
allogeneic hematopoietic stem cell transplantation**

**Diplomová práce**

Vedoucí práce: Ing. Jakub Mrázek, PhD.  
Odborný konzultant: MUDr. Ludmila Nováková

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze této diplomové práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 29. 11. 2020

.....

Petra Michková

**Identifikační záznam:**

MICHKOVÁ, Petra. *Změny mikrobiálního osídlení trávicího traktu u pacientů po alogenní transplantaci hematopoetických buněk. [Changes in microbial colonization of gastrointestinal tract in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation]*. Praha, 2020. 89 s., 2 příl. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, III. interní klinika – klinika endokrinologie a metabolismu 1. LF a VFN v Praze. Vedoucí práce: Ing. Jakub Mrázek, PhD.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Jakubovi Mrázkovi PhD. za jeho čas a pomoc během výzkumu a při zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat PostDoc. Chahrazed Mekadim, PhD. za její pomoc při zpracování NGS analýzy. Velké dík patří MUDr. Ludmile Novákové a celému týmu transplantačního oddělení za jejich pomoc a ochotu. Stejně tak děkuji i pacientům ÚHKT, kteří poskytli vzorky k analýze. Nakonec bych chtěla poděkovat Mgr. Ing. Marii Hemmrové a svým kolegyním Ing. Janě Markové PhD. a RNDr. Kamile Čermákové za velmi cenné připomínky k mé práci a za podporu, kterou mi po celou dobu vyjadřovaly.

## Abstrakt

**Východiska:** Fyziologická mikroflóra se vyznačuje širokou diverzitou. Mikrobiální komunita se skládá převážně z bakterií, ale zahrnuje také houby, archaea a viry. V tlustém střevě dominují z 90 % především anaerobní komenzální bakterie (Firmicutes a Bacteroidetes). Složení a produkty střevní mikrobioty mají významný vliv na imunitní systém jedince, jejich vzájemné interakce mohou ve výsledku podpořit imunitní toleranci nebo zánětlivou imunitní odpověď. Transplantace krvetvorných buněk (HSCT) a s ní související standardní postupy, kterými jsou kondicionování, expozice antibiotikům a dietní profylaxe, představují modifikaci a disrupci střevní mikrobioty, která vede k rozvoji některých závažných posttransplantačních komplikací s dopadem na OS (overall survival) a TRM (treatment related mortality) pacientů.

**Cíle práce:** Cílem této práce bylo zjistit zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů u pacientů, kteří podstupují alogenní HSCT a dále vliv transplantace na složení a rozmanitost jejich střevní mikrobioty.

**Metodika:** Vzorky stolice byly získány od 52 pacientů, kteří podstoupili v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze alogenní transplantaci hematopoetických buněk. Termín pro odebrání prvního vzorku byl stanoven na začátek hospitalizace zpravidla v období před zahájením přípravného režimu, druhý vzorek byl odebrán v období po transplantaci do konce hospitalizace. Pro analýzu mikrobioty byla použita molekulárně genetická metoda PCR 16S ribosomálního genu bakterií, po které následovalo sekvenování jednotlivých bakteriálních taxonů metodou NGS (sekvenování nové generace). Testování vzorků proběhlo v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky (ÚŽFG) Akademie věd ČR.

**Výsledky:** Střevní mikrobiota je vysoce dynamický systém, který je u příjemců alo-HSCT doprovázen ztrátou některých bakteriálních taxonů za velmi krátký časový úsek po transplantaci. Zatímco před transplantací u pacientů dominuje třída Clostridia kmene Firmicutes po transplantaci dochází k monodominanci třídy Bacilli, s expanzí *Enterococcus* spp. Zároveň dochází u pacientů po transplantaci ke snížení diversity a úbytku některých rodů a druhů bakteriálních mikroorganismů.

**Závěr:** V této studii se prokázalo, že alo-HSCT má vliv na změnu ve složení a rozmanitosti střevní mikrobioty pacientů.

**Klíčová slova:** HSCT, NGS, prebiotika, probiotika, SCFA, střevní mikrobiota

## **Abstract**

**Introduction:** Physiological microflora is characterised by wide diversity. The microbial community is mostly composed of bacteria, but also includes fungi, archaea and viruses. Anaerobic commensal bacteria (Firmicutes and Bacteroidetes) dominate 90% of the colon. The composition and products of the gut microbiota have a significant effect on an individual's immune system, and their interactions may ultimately promote immune tolerance or inflammatory immune response. Blood cell transplantation (HSCT) and its associated standard procedures of conditioning, antibiotic exposure and dietary prophylaxis represent modification and disruption of the gut microbiota leading to the development of some serious post-transplant complications affecting the OS (overall survival) and TRM (treatment related mortality) of patients.

**Objectives:** The aim of this work was to investigate the representation of individual bacterial strains in patients undergoing allogeneic HSCT, as well as the effect of transplantation on the composition and diversity of their gut microbiota.

**Methods:** Stool samples were obtained from 52 patients who underwent an allogeneic hematopoietic cell transplant at the Institute of Hematology and Blood Transfusion in Prague. A cut-off date for the first sample was set for the start of hospitalisation, generally in the pre-treatment period, while a second sample was taken in the post-transplant period until the end of hospitalisation. The molecularly genetic method PCR 16S of the bacteria ribosomal gene was used for the analysis of the microbiota, followed by sequencing of individual bacterial taxa with the NGS method (new generation sequencing). Testing of the samples took place at the Institute of Animal Physiology and Genetics (IAPG) of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

**Results:** The gut microbiota is a highly dynamic system that in allo HSCT recipients is accompanied by the loss of some bacterial taxons in a very short time after transplantation. While pre-transplant patients dominate the Clostridia class of the Firmicutes strain post-transplant, Bacilli class monodominance occurs, with the expansion of *Enterococcus* spp. At the same time, there is a reduction in diversity in transplant patients and a decrease in some genera and species of bacterial microorganisms.

**Conclusion:** In this study, allo HSCT has been shown to have an effect on change in the composition and diversity of patients' gut microbiota.

**Keywords:** HSCT, gut microbiota, NGS, prebiotics, probiotics, SCFA

## Obsah

1.	Úvod .....	3
2.	Lidská mikrobiota .....	5
2.1.	Mikrobiota ve vztahu ke zdraví a nemoci .....	5
2.2.	Role mikrobioty ve vztahu k slizniční imunitě .....	6
2.3.	Vývoj diferencovaných epitelových buněk střevní sliznice .....	6
2.4.	Úloha střevních epitelových buněk ve vztahu k slizniční imunitě .....	7
2.5.	Regulace imunitní odpovědi mikrobiotou .....	8
2.6.	Vývoj T-lymfocytů ve vztahu k mikrobiotě .....	9
2.6.1.	Význam T regulačních lymfocytů .....	9
2.7.	PRR receptory ve vztahu k slizniční imunitě .....	10
2.8.	Ochrana hostitele před exogenními patogeny komenzální mikrobiotou – rezistence ke kolonizaci .....	11
2.9.	Bakterie .....	12
2.10.	Faktory, které ovlivňují složení střevní mikrobioty .....	15
2.10.1.	Genetický vliv .....	15
2.10.2.	Strava .....	15
2.10.3.	Antibiotika .....	16
2.10.4.	Věk .....	16
2.10.5.	Stravovací návyky .....	16
2.11.	Metabolická role střevní mikrobioty .....	17
2.12.	Mikrobiální fermentace .....	17
2.12.1.	Fyziologický efekt produktů mikrobiální fermentace .....	19
2.13.	Role probiotik ve vztahu k mikrobiotě .....	23
2.13.1.	Pozitivní účinky probiotik .....	23
2.14.	Role prebiotik ve vztahu k mikrobiotě .....	25
2.14.1.	Mechanismy působení prebiotik na zdraví hostitele .....	26
3.	Transplantace hematopoetických buněk .....	27
3.1.	Hematopoetická kmenová buňka (HC) .....	27
3.2.	Transplantace hematopoetických buněk (HSCT) .....	27
3.3.	Přípravné režimy .....	28
3.4.	Komplikace HSCT v souvislosti se střevní mikrobiotou .....	28
3.4.1.	Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) .....	29
3.4.2.	Relaps onemocnění .....	31

3.4.3.	Infekční komplikace .....	31
3.4.4.	Plicní komplikace .....	32
3.5.	Faktory ovlivňující průběh onemocnění a přežití .....	32
3.5.1.	Vliv mikrobiální diversity .....	32
3.5.2.	Vliv výživy .....	33
3.5.3.	Vliv antibiotické léčby.....	34
3.6.	Možnosti modifikace střevní mikrobioty a její diagnostické využití u pacientů podstupujících HSCT.....	35
3.6.1.	Probiotické a prebiotické strategie u pacientů po alo-HSCT .....	35
3.6.2.	FMT – transplantace střevní mikrobioty .....	36
3.6.3.	Diagnostika stavu mikrobioty .....	39
4.	Cíle práce .....	40
5.	Metodika práce .....	41
5.1.	Charakteristika pacientů .....	41
5.2.	Izolace bakteriální DNA pomocí kitu QIAamp® PowerFecal® DNA Kit (Qiagen).....	41
5.3.	PCR (Polymerázová řetězová reakce).....	42
5.4.	NGS analýza mikrobiální diversity.....	44
5.5.	Analýza získaných dat .....	55
6.	Výsledky.....	56
6.1.	Stanovení bakteriální diversity metodou NGS.....	56
6.2.	Hodnocení změn mikrobiální diversity vlivem transplantace.....	56
6.3.	Určení taxonomie bakteriálních zástupců .....	60
6.3.1.	Obecné změny mikrobioty v důsledku transplantace .....	60
6.3.2.	Detailní hodnocení změny mikrobioty v důsledku transplantace.....	62
7.	Diskuse.....	65
8.	Závěr .....	69
9.	Reference.....	70
	Seznam zkratk.....	87
	Seznam tabulek a obrázků.....	89
	Přílohy.....	I



## 1. Úvod

Výzkum lidské střevní mikrobioty nabyl v posledním desetiletí na významu. Díky technologiím sekvenování nové generace (NGS) a „multi-omického“ přístupu se podařilo objasnit roli mikrobiální komunity ve vztahu s fyziologií a patofyziologií hostitele. Ukázalo se, že rostoucí počet lidských chorob a patologií je spojen se střevní mikrobiotou.

Jedním z hlavních mechanismů, kterým mikrobiota ovlivňuje svého hostitele, se uskutečňuje prostřednictvím interakce s imunitním systémem. Tyto interakce s vrozenou i adaptivní intestinální i extraintestinální imunitou mohou být komenzální, vzájemné, ale v některých případech naopak mohou vést k vážným účinkům ohrožujícím zdraví hostitele. V případě alogenní transplantace kmenových hematopoetických buněk (alo-HSCT) je narušení diverzity střevní mikrobioty spojeno především s komplikací vzniku akutního GVHD (reakce štěpu proti hostiteli), které způsobuje zánět střeva, jater, plic a kůže u 40 – 50 % pacientů podstupujících alo-HSCT a podílí se na významném vzestupu posttransplantační úmrtnosti (1).

Lidské tělo je kolonizováno množstvím mikroorganismů, které se označují jako mikrobiota, jejich přidružené genomy se nazývají mikrobiomy. Ačkoliv většinu těchto mikroorganismů tvoří bakterie, významná je i přítomnost virů, hub a archeí. Střevní mikrobiota ve vztahu k hostiteli plní různé funkce. Mezi ně patří vývoj a zrání imunitního systému, trávení potravy, syntéza esenciálních aminokyselin, sekundárních metabolitů, mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a vitamínů, metabolismus xenobiotik, modulace imunitní odpovědi a odolnost vůči patogenům.

U zdravého jedince představuje střevní mikrobiota vyvážené složení komenzálů, symbiontů a patobiontů udržující funkční homeostázu nezbytnou pro lidské zdraví. Složení střevní mikrobioty je vzhledem k individuální specifičnosti ovlivněno věkem, genetikou a geografickou polohou (2). Kromě toho se střevní mikrobiota mění vlivem vnějších faktorů prostředí, kterými jsou zásadní změny stravy, léčba antibiotiky a významné změny životního stylu. Někdy tyto změny způsobí snížení symbiontů a komenzálů a zvýšení patobiontů, což narušuje symbiotickou rovnováhu. Změny ve střevní mikrobiotě mohou mít závažný dopad na imunitní systém hostitele a úspěšnost léčby u řady maligních a benigních hematologických onemocnění, u kterých představuje alogenní transplantace kmenových buněk jediný způsob léčby.

Obranný systém hostitele zahrnuje buněčnou imunitu, neporušenou střevní bariéru a vyváženou mikroflóru. U pacientů, kteří podstupují alo-HSCT, jsou velmi často tyto obranné mechanismy porušeny vlivem terapie vyžadující imunosupresi a cytotoxickou chemoterapii, které vedou k těžké neutropenii s masivním poškozením střevní bariéry (mukozitida). Kromě toho podání profylaktických antibiotik, která jsou používána k dekontaminaci střev, vede k významné nerovnováze v mikrobiální komunitě střev, a umožňuje tak kolonizaci patogeny, kmeny rezistentními na antibiotika, které mohou nakonec prostřednictvím mikrobiálního šíření ze střeva způsobit sepsi a rozvoj GVHD.

Studie zaměřené na složení mikroflóry u pacientů před a po alo-HSCT uvádějí

drastickou ztrátu bakteriální diversity po léčbě. Ztráta diversity mikroflóry souvisí se zvýšeným rizikem rozvoje infekce a GVHD. Pokles rozmanitosti po alo-HSCT je často doprovázen expanzí jednoho taxonu. Ve většině případů se jedná o zvýšení hojnosti členů rodu *Enterococcus* a snížení členů řádu Clostridiales včetně *Faecalibacterium* spp. a *Ruminococcus* spp., tedy druhů, které patří mezi významné producenty SCFA, hlavně butyrátu, imunomodulačního metabolitu. Naopak nález vyšší četnosti dalšího člena řádu Clostridiales (rod *Blautia*) je spojen se sníženou úmrtností v souvislosti s GVHD. Kromě zmíněné produkce imunomodulačních metabolitů je střevní komenzální mikrobiota schopna bránit kolonizaci střeva patogeny prostřednictvím produkce antimikrobiálních peptidů Panethovými buňkami střeva. Pokles antimikrobiálních peptidů koreluje s výskytem těžké GVHD. Mezi další bakteriální metabolity, které udržují integritu a bariérovou funkci epiteliální vrstvy, patří například žlučové kyseliny a ligandy aryl-uhlovodíkových receptorů (3).

Modulace střevní mikrobioty může představovat potenciální terapeutický cíl ke zmírnění nebo k prevenci GVHD u pacientů po allo HSCT. Mikrobiota ve střevě může být manipulována výběrem antibiotik, použitím probiotik/prebiotik k repopulaci střev komenzály a dále pomocí FMT (transplantace fekální mikroflóry). Dalšími způsoby modulace jsou geneticky upravené bakterie, fagemidy CRISPR-CAS9, bakteriální ligandy a/nebo protilátky specifické pro patogen.

Změny v mikrobiotě mohou také sloužit jako neinvazivní biomarker jejího složení. Příkladem nedávno navrženého biomarkeru je metabolit tryptofanu 3-indoxyl sulfát, který vzniká přeměnou tryptofanu na indol účinkem tryptofanázy komenzálních bakterií. Po resorpci indolu ze střeva se metabolizuje v játrech na indoxyl sulfát a nakonec se vylučuje močí.

Často používanými technikami mikrobiálního profilování jsou Sangerovo sekvenování, sekvenování nové generace (NGS, Next Generation Sequencing), které se většinou opírají o analýzu genu 16S ribozomální RNA. Gen kódující 16S rRNA podjednotku obsahuje oblasti, které jsou vysoce konzervativní mezi různými druhy bakterií, a devět hypervariabilních oblastí, které jsou jedinečné pro specifické bakteriální druhy. Bakteriální komunity lze identifikovat sekvenováním těchto variabilních oblastí.

## 2. Lidská mikrobiota

Mikrobiota je ekologické společenství symbiotických, komenzálních i patogenních mikroorganismů, kteří osidlují různé části lidského těla. Zahrnuje viry, bakteriofágy, bakterie, houby a parazity. Interakce mezi člověkem a mikrobiotou jsou velmi rozmanité. Zahrnují vztahy vzájemné výhody (komezalizmus), patogenity a neutrality. Existují i vzájemné vztahy uvnitř mikrobioty.

Mikrobiota jedince je přísně individuální a je determinována genetickou dispozicí člověka a vlivem faktorů vnějšího prostředí, které mohou působit epigeneticky, a ovlivňovat tak přepis jednotlivých genů. Mezi modifikující životní podmínky ve vztahu k mikrobiotě patří kojení, výživa, vliv antibiotik a současný omezený kontakt člověka s přirozenými mikrobiálními podněty.

Autochtonní (neměnná) složka mikrobioty je za fyziologických podmínek udržována celý život. Proměnlivá část mikrobioty se nazývá alochtonní a vykazuje vysokou proměnlivost. Mikrobiota je v jednotlivých částech lidského těla odlišná a uzpůsobená potřebám dané lokality (4).

### 2.1. Mikrobiota ve vztahu ke zdraví a nemoci

Mnoho bakterií, které trvale osidlují lidské střevo, vytváří vzájemný vztah s hostitelem a jsou pro něj prospěšné. Kromě těchto prospěšných bakterií je lidský GI trakt spojen s několika komenzály, kteří nepředstavují žádnou újmu ani výhodu pro svého hostitele. Střevní mikrobiota obsahuje také potencionálně škodlivé druhy, které jsou pravděpodobně v těsnějším spojení s epitelem a jsou definovány jako patobionty (5, 6).

Součet všech symbiotických interakcí mezi hostitelem a mikrobiotou i mezi společenstvím mikrobů navzájem vede k eubióze – rovnovážnému stavu, který je nezbytný k udržení střevní, imunitní a metabolické homeostázy. Když se v mikrobiálním ekosystému ztratí vzájemný vztah mezi členy mikrobioty, metabolickými produkty a hostitelským imunitním systémem, objeví se stav zvaný dysbióza.

V dysbiotickém ekosystému dochází obecně k přerůstání potencionálně patogenních mikrobů na úkor prospěšných druhů. Pozorováno je i celkové snížení střevní diversity a paralelní nárůst patobiontů (7–9). Přestože 40 % mikrobiálních genů může být sdíleno až v polovině populace, podstatné interindividuální a intraindividuální rozdíly ve složení střevní mikrobioty komplikují definici zdravé mikrobioty (10). Dysbiotický stav je charakterizován celkovou redukcí prospěšných bakteriálních druhů (laktobacilů a bifidobakterií), ke kterému může dojít v důsledku nezdravé stravy (11), antibiotickou terapií (12), nebo může být spojen s potravinovou intolerancí v důsledku nedostatku trávicích enzymů (nesnášenlivost mléka nebo masa) (13).

Putrefaktivní dysbióza, která se vyznačuje nárůstem kmene *Bacteroides*, je obvykle výsledkem stravy bohaté na maso a chudé na obsah vlákniny (14). Metabolizací této stravy vzniká amoniak, aminy a fenoly, které mohou být příčinou klinických příznaků, které se neomezuji pouze na gastrointestinální trakt. Dysbióza je také charakterizována přerůstáním bakterií v tenkém střevě v důsledku snížené produkce žaludeční kyseliny s nadbytkem bakteriální fermentační aktivity (15).

Fermentativní dysbióza často postihuje pacienty se syndromem dráždivého tračníku (16), dále pacienty, kteří jsou léčeni antibiotiky a ty, kteří ve své stravě záměrně snižují zastoupení sacharidů (nízko fermentovatelné oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly – tzv. FODMAP dieta). Získaná dysbióza je spojena se ztrátou tolerance střevní mikrobioty často z genetických příčin (abnormální střevní odpověď na složky mikrobioty) a je spojena s IBD a dalšími podobnými chorobami (17).

Kvasinková dysbióza je charakterizována přemnožením *Candida* nebo jiných kvasinkových druhů ve střevní mikrobiotě a je podporována stravou bohatou na jednoduché cukry a nízký obsah vlákniny (18).

## 2.2. Role mikrobioty ve vztahu k slizniční imunitě

Úkolem střevní sliznice je koexistovat se symbiotickými mikroby a zároveň zabránit mikrobiálnímu růstu a invazi patogenů. Ve zdraví je slizniční imunitní systém schopen rozpoznat mikrobiální signály, které pocházejí ze symbiontů i patogenů a vyvolat přiměřenou odpověď, která není škodlivá ani lokálně ani systémově. Indukce přiměřené odpovědi lze dosáhnout především fyzickým oddělením mikrobioty od povrchu střevního epitelu, hlenovou vrstvou, produkcí IgA specifických protilátek B-lymfocyty a aktivací prozánětlivých (Th1 a Th17) i protizánětlivých (Treg) lymfocytů v rámci rozvoje adaptivní imunitní odpovědi. Tento stav, který zabraňuje aktivaci imunitního systému proti neškodným bakteriím, ale zároveň udržuje imunitní systém sliznice připravený na případnou invazi patogenními mikroorganismy, je definován jako fyziologický střevní zánět a je zásadní pro udržení homeostázy na slizničním rozhraní (19).

## 2.3. Vývoj diferencovaných epitelových buněk střevní sliznice

Do lumen tenkého střeva vyčnívají prstovité výběžky – klky (villi), které leží poblíž tubulárních invazí, známých jako Lieberkühnovy krypty. Tlusté střevo, které je uzpůsobeno především na absorpci vody, elektrolytů a produktů mikrobiální fermentace, je tvořeno pouze kryptami (20). Základnu krypt ve střevě tlustém a klků ve střevě tenkém tvoří cyklicky se obměňující populace sloupcových kmenových buněk, jejichž dělením vznikají dceřiné tranzitní amplifikační buňky, které se pohybují směrem vzhůru po kryptě a diferencují se pod vlivem růstových faktorů do rozličných epitelálních linií (21, 22). Diferencované epitelové

buňky zahrnují absorpční enterocyty, M buňky a buňky sekreční linie, kterými jsou pohárkové buňky, enteroendokrinní buňky, chomáčkové buňky, Panethovy buňky v tenkém střevě a hluboké kryptické sekreční buňky ve střevě tlustém. V okamžiku, kdy dosáhnou epitelové buňky vrcholu krypt nebo klků, podléhají apoptóze a jsou uvolněny do střevního lumen. Tento cyklický děj obvykle trvá 4 – 5 dnů (21–23).

## 2.4. Úloha střevních epitelových buněk ve vztahu k slizniční imunitě

Všechny typy diferencovaných buněk se podílejí na vytvoření funkční intestinální epitelové bariéry a na stratifikaci mikroorganismů ve střevním lumen, díky kterým je omezena jejich interakce s hostitelem.

Enterocyty, diferencované epitelové buňky, jsou strukturně polarizovány tak, že do střevního lumen směřují svým apikálním povrchem a bazolaterální povrch směřuje do oblasti lamina propria. Tato polarizace je upevněna prostřednictvím odlišných proteinů, které se nacházejí na laterální straně enterocytů a podílejí se na vytvoření pevných mezibuněčných spojů, kterými ovlivňují permeabilitu a transepiteliální výměnu vody a iontů mezi epitelovými buňkami. Pevné spoje mezi buňkami tvoří základní bariéru, která brání proniknutí mikroorganismů z lumen do vrstvy lamina propria (24).

Absorpční enterocyty tvoří polymerní imunoglobulinový receptor (pIgR) a transmembránové muciny, které se podílejí na tvorbě glykokalyxu, struktury, která je bohatá na sacharidy a je spojena s membránou epitelových buněk. Funkcí glykokalyxu je omezení kontaktu mezi patogeny a apikálním povrchem enterocytů.

Prostřednictvím pIgR receptoru se uskutečňuje transcytóza IgA protilátek produkovaných B-lymfocyty lamina propria z bazolaterální strany enterocytů na apikální povrch směřující do lumen (25, 26).

Pohárkové buňky secernují do lumen krypt glykoproteiny, mezi které patří mucin (MUC 2), a podílejí se tak na vytvoření mukózní vrstvy. V tenkém střevě se mucin, který difunduje z krypt, mísí s antimikrobiálními peptidy a s IgA protilátkami (26, 27).

Panethovy buňky kromě produkce antimikrobiálních peptidů (alfa defensiny, lysozym C, REG III beta, REG III gama, angiogenin 4) poskytují růstové faktory sloupcovým kmenovým buňkám, které se nacházejí na dně krypt (28, 29).

Enteroendokrinní buňky produkují peptidy a hormony, jako jsou cholecystokinin a serotonin, které ovlivňují střevní peristaltiku a napomáhají obnovení mukózní vrstvy (30).

Chomáčkové buňky přispívají k ochraně proti parazitům přítomným ve střevním lumen prostřednictvím produkce IL-25, čímž se podílejí na regulaci Th2 buněčné odpovědi (31).

M buňky, které se nacházejí v epitelové vrstvě ohraničených lymfoidních struktur, zachycují antigeny, které přecházejí z lumen do subepiteliálních prostor, kde jsou následně zpracovány dendritickými buňkami a migrují do mesenterických lymfatických uzlin, kde probíhá stimulace T a B buněčné odpovědi (32, 33).

Mezi epitelovými buňkami se také nacházejí intraepitelové T-lymfocyty, jejichž počet může výrazně stoupat v souvislosti s probíhajícím zánětem. Přispívají k obranné reakci epitelové vrstvy produkcí antimikrobiálních peptidů (AMP), ale i přímou cytotoxickou aktivitou (4). Jde o populaci T-lymfocytů CD8<sup>+</sup>, s receptorem TcR typu alfa/beta, které na svém povrchu exprimují heterodimer CD 103<sup>+</sup>.

## 2.5. Regulace imunitní odpovědi mikrobiotou

Významná část imunitního systému je zaměřena na kontrolu vztahu hostitele s mikrobiotou. Nejvyšší počet imunitních buněk se nachází v místech, která jsou kolonizována komenzály. Jde zejména o kůži a GIT. Udržení homeostatického vztahu mezi komenzální mikrobiotou a hostitelem je uskutečňováno kombinovaným působením epiteliálních buněk, produkcí hlenu, IgA protilátek, antimikrobiálních peptidů a odezvou imunitních buněk. Souhrnně se tyto strukturní a imunologické komponenty označují jako „mucosal firewall“ (34).

Hlen, který je produkován pohárkovými buňkami, vytváří spolu s antimikrobiálními peptidy primární bariéru, která zabraňuje mikrobiální translokaci. Antimikrobiální peptidy jsou produkovány intestinálními epiteliálními buňkami a jejich funkce spočívá v enzymatickém napadení bakteriální buněčné stěny nebo v narušení vnitřní bakteriální membrány. Antimikrobiální peptidy jsou buď konstitutivně exprimovány epiteliálními buňkami, nebo je pro jejich sekreci nutné zapojení PRR receptorů, které se nacházejí na povrchu epitelových buněk (35). Mezi nejlépe prostudované antimikrobiální peptidy patří RegIII gama protein, který má přímý mikrobiocidní účinek na grampozitivní bakterie (36). Akumulace těchto peptidů v hlenu se spolupodílí na vytvoření fyzické bariéry, která přispívá k udržení segregace mezi mikrobiotou a střevní sliznicí hostitele.

Komenzálové, kteří přestoupí přes intestinální bariéru epiteliálních buněk, mohou být rychle pohlceni a eliminováni rezidentními makrofágy, které se nacházejí v lamina propria. Případně mohou být dendritickými buňkami CD 103<sup>+</sup> CD 11b<sup>+</sup> přeneseny do mezenterických lymfatických uzlin umístěných v lamina propria, kterými však neprocházejí (37). Prezentace komenzálních antigenů CD 103<sup>+</sup> CD 11b<sup>+</sup> dendritickými buňkami vede k diferenciaci komenzálních specifických Treg lymfocytů v Peyerových placích a ke tvorbě IgA protilátek B-lymfocyty v oblasti lamina propria (38). Sekreční IgA protilátky, které jsou produkovány plazmocytů, migrují skrze lamina propria a transcytózou přes epiteliální buňky přestupují do slizniční vrstvy, kde prostřednictvím genové exprese regulují adhezi komenzálních bakterií na epitelové povrchy (39). Mechanismus tvorby sekrečních IgA protilátek je také regulován specializovanými Treg, které se nacházejí v germinálních centrech Peyerových plaků, jedná se o tzv. folikulární regulační T-lymfocyty (Tfr) (40).

## 2.6. Vývoj T-lymfocytů ve vztahu k mikrobiotě

V GI traktu se nachází také většina paměťových nebo aktivovaných T buněk (Th1 a Th 17), jejichž vývoj je indukován mikrobiotou. Buňky Th17 se vyznačují produkcí cytokinů IL-17 a IL-22. Zkoumáno bylo především působení IL-22 na slizniční imunitní systém. IL-22 podporuje produkci antimikrobiálních peptidů, zvyšuje regeneraci epitelu a reguluje hojení ran (41). Tento cytokin může být produkován i jinými buněčnými liniemi, mezi které patří vrozené lymfoidní buňky typu 3 (ILC 3). Produkce IL-22 těmito buňkami podporuje osídlení některými specifickými kmeny mikrobioty ve slizničních lymfoidních strukturách.

Většina buněk imunitní odpovědi je soustředěna do oblasti lamina propria sliznice. Transport antigenních i patogenních mikroorganismů je zajišťován M buňkami, které jsou umístěny v Peyerových plátech v oblasti tenkého střeva. Antigenní materiál, který je přenesen do lamina propria a je pohlcen dendritickými buňkami CD 103<sup>+</sup> CD 11 b<sup>+</sup>, je prezentován T-lymfocytům. V závislosti na antigenní stimulaci jsou T-lymfocyty diferencovány do dalších subtypů (4).

Pro zajištění běžné ochrany sliznic jsou zmnoženy a diferencovány subtypy Th2 lymfocytů a Treg lymfocytů, které indukují izotypový přesmyk v B-lymfocytech s následnou produkcí IgA sekrečních protilátek. Odpovědí na virem infikované buňky je přednostní vyžrávání subtypu Th1 cytotoxických buněk. Buňky napadené bakteriemi nebo houbami vedou k vyžrávání subtypu Th17, který prostřednictvím IL-17 a IL-23 vede k akumulaci neutrofilních granulocytů, hlavních efektorů obranného zánětu. Dalšími buňkami, které se účastní obranné imunitní odpovědi, jsou makrofágy (subtyp M1a s prozánětlivými aktivitami a subtyp M2c, který produkuje IL-10 s protizánětlivým účinkem) a dále žírné buňky, které pod vlivem nejčastěji IgE protilátek uvolňují biologicky aktivní látky, a podílejí se tak na rozvoji zánětlivé obranné reakce.

Plně diferencované T- a B-lymfocyty na základě tzv. homingových molekul integrují s adresiny na buňkách HEV (vény s vysokým endotelem) a následně migrují do lymfatických uzlin a dále do tkáňových prostor (4).

### 2.6.1. Význam T regulačních lymfocytů

Treg lymfocyty se uplatňují především při imunoregulaci. Tlumí celou řadu imunitních reakcí, včetně odpovědi na tělu vlastní antigeny, aloantigeny, nádorové antigeny, patogenní a komenzální mikroorganismy. Mezi tzv. přirozené T regulační buňky patří CD4<sup>+</sup> lymfocyty s expresí alfa řetězce receptoru pro IL-2 (CD25<sup>+</sup>) a FOXP3 transkripční faktor. Jejich vývoj probíhá v thymu jako odpověď na přítomné autoantigeny. Podílejí se na udržení periferní autotolerance a brání rozvoji autoimunitních procesů. Podobné buňky tzv. indukované iTreg jsou odvozené z cirkulujících CD4<sup>+</sup> buněk, které jsou aktivovány v přítomnosti antigenu, TGF beta a vitaminu A. Jejich indukce probíhá v gastrointestinálním traktu a udržují jak periferní, tak slizniční homeostázu hostitele a jejich narušení má za následek ztrátu orální tolerance a rozvoj atypických efektorových odpovědí ve střevě. Předpokládá se, že působí

prostřednictvím produkce imunosupresivních cytokinů a IL-10. Na zvýšení sekrece IL-10 Treg buňkami se podílí například i vitamín D3. Indukované Treg lymfocyty za fyziologických podmínek omezují odpověď Th2 buněk na komenzální bakterie a prostřednictvím Th1 a Th17 buněk regulují odpověď na patogenní bakterie, a chrání tak hostitele před nadměrným poškozením tkání (42–44). Buňky iTreg a Th17 buňky sdílejí stejný vývojový požadavek na signalizační dráhu transformující růstový faktor TGF beta a na kofaktor pro kyselinu retinovou. V přítomnosti některých mikrobiálních antigenů, zvláště těch, které jsou odvozené od prozánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$  a IL-6), je účinek kyseliny retinové potlačen, vývoj iTreg je blokován a může být přesměrován ve prospěch tvorby T efektorových buněk Th1 a Th17 s produkcí interferonu gama nebo IL-17 (45). Vývoj iTreg může být stimulován specifickými bakteriálními komponenty, které zahrnují antigeny druhu *Bacteroides fragilis* a klostridii tvořící spory (46). Polysacharid A (PSA) indukuje Treg buňky prostřednictvím TLR2 receptoru a vede k uvolnění IL-10. Tento protektivní účinek *B. fragilis* byl popsán u myši, které chránil před rozvojem kolitidy vyvolané komenzálem s patogenními účinky (*Helicobacter hepaticus*) (47). Významný je i vliv antibakteriálních látek namířených proti G<sup>+</sup> bakteriím, které blokují TLR receptor a protein primární myeloidní diferenciaci 88 (MYD88) vrozené imunitní signalizační cesty klíčové pro rozvoj T regulačních lymfocytů (48, 49).

## 2.7. PRR receptory ve vztahu k slizniční imunitě

Udržení tolerance vůči komenzální mikrobiotě závisí na konstitutivních a indukovatelných obranných mechanismech. Konstitutivní mechanismus představuje střevní epitelová vrstva, která fyzicky brání mikroorganismům proniknout do hostitele. Indukovatelné mechanismy zahrnují různé typy imunitních a neimunitních buněk, které se podílejí na posílení funkce střevní epitelové bariéry nebo na podpoře imunomodulačního prostředí v lamina propria. Aktivace těchto indukovatelných mechanismů vyžaduje rozpoznání mikrobiálních vzorů MAMP, vzorů patogenních PAMP a vzorů vnitřního poškození DAMP hostitelskými buňkami prostřednictvím PRR receptorů na povrchu epitelových buněk (50). V souvislosti s tím bylo popsáno několik rodin PRR receptorů včetně TLR (51, 52), NOD like receptorů (53), C-typ lektinových receptorů (54), RIG-I (55), AIM2 (56) a cGAS receptorů (57).

TLR receptory jsou nejlépe prostudované a patří mezi transmembránové proteiny, které jsou lokalizovány na membráně a v endosomech epitelových buněk. Mají významné antimikrobiální funkce. Regulačním mechanismem zabraňují přehnaným reakcím na komenzální mikrobiotu. Zesilují epitelovou bariéru tím, že se podílejí na indukci upevnění pevných mezibuněčných spojení, na produkci antimikrobiálních peptidů a hlenu a na produkci reaktivních forem kyslíku. Podílejí se i na reparaci poškozené intestinální epitelové vrstvy. Dysregulace těchto receptorů vede ke snížené schopnosti „očišťování“ od patobiontů a narušení mikrobiálního rozložení může vést k rozvoji zánětlivého onemocnění střeva a tumorigenezi (58).

Mechanismus účinku TLR receptorů spočívá ve schopnosti rozpoznat struktury G<sup>+</sup> a



G<sup>-</sup> bakterií, flagelin, jednovlákné i dvouvlákné RNA, nemethylované CpG DNA a mnohé další DAMP (51, 59, 60). Interakce extracelulární domény TLR receptoru, která je bohatá na leucin opakující se sekvence, rozpozná tyto ligandy a po jejich navázání dochází k dimerizaci receptoru a k následné aktivaci intracelulární Toll/IL-1 (TIR) domény.

Aktivovaná TIR doména umožňuje interakci s cytosolovými adaptéry, kterými jsou MYD88 a TICAM1 (TRIF) adaptéry (61, 62). Navázané adaptéry prostřednictvím TIR domény spouští signální kaskádu, která vede k aktivaci NF- $\kappa$ B aktivačního proteinu 1 (AP-1) a IRF3 transkripčního faktoru (59, 61, 63). Aktivací těchto transkripčních faktorů je v jádře zahájena syntéza prozánětlivých cytokinů (IL-6, TNF, pro-IL-1 beta), ale i syntéza antivirového interferonu, IFN alfa a IFN beta, které aktivují anti-apoptotickou nebo proliferativní dráhu (59, 64–66).

## 2.8. Ochrana hostitele před exogenními patogeny komenzální mikrobiotou – rezistence ke kolonizaci

Komenzálové mohou také přímo reagovat s patogeny a imunitními buňkami a tato interakce může předurčovat patogenezí a rozvoj dané infekce. Ochrana hostitele před exogenními patogeny komenzálními bakteriemi je fenomén, který byl nazván rezistence ke kolonizaci (67).

Jedna z hlavních forem interakce mezi komenzální mikrobiotou a invazivními mikroby je soutěž o stejnou ekologickou niku. Komenzálové mohou omezovat kolonizaci patogenní flóry prostřednictvím změny dostupnosti živin hostitelskou mikrobiotou, a ovlivnit tak expresi některých virulentních kmenů například enterohemoragické *E. coli* nebo *Clostridium difficile* (68). Komenzálové mohou také podpořit vytvoření nepřátelského prostředí pro založení patogenu. Příkladem je působení *Lactobacillů* ve vaginálním prostředí, které snižuje pH, a zabraňuje tak patogenní kolonizaci (69).

Někteří komenzálové mohou také produkovat přímo antimikrobiální peptidy, které ovlivní růst a přežití patogenu (70). Příkladem je *E. coli* produkující bakteriociny, které specificky inhibují růst stejných nebo podobných bakteriálních kmenů, a tím narušují růst souvisejícího patogenu – enterohemoragické *E. coli*. Dominantní kožní komenzál *Staphylococcus epidermidis* produkuje několik antimikrobiálních proteinů a proteáz, které mohou omezit tvorbu *Staphylococcus aureus* (71). Dalším antimikrobiálním peptidem je REG III g, který se uplatňuje nejen na udržení segregace mezi mikrobiotou a epitelálními buňkami, ale také podporuje ochranu proti definovaným patogenům, jako je například vancomycin-rezistentní *Enterococcus faecalis* (49).

K narušení rezistence ke kolonizaci v GI traktu dochází nejčastěji vlivem antibiotik, negativním vlivem potravy, virovými infekcemi a imunopatologickými procesy (celiakie), které vedou k pomnožení patogenní mikrobioty. Mezi patogenní mikrobiotu patří kmen *Proteobacteria* zahrnující čeleď *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*), *Vibrionaceae* a *Campylobacteriaceae*. Tyto fakultativně anaerobní bakterie, které se objevují brzy po narození, jsou postupně nahrazeny anaerobní mikrobiotou a v dospělosti

tvoří jen minimální součást fyziologické mikrobioty. V případě, že dojde k narušení mikrobioty, převládají tyto fakultativně anaerobní mikroorganismy v čele s *E. coli* a *Enterococcus* (4).

## 2.9. Bakterie

Bakterie jsou systematicky tříděny do kmenů (phylum), tříd (classis), řádů (ordo), čeledí (familia), rodů (genus) a druhů (species) a společně s Archaea a Eukaryota vytvářejí ekosystém lidského střeva. V ekosystému lidského střeva dominují bakterie, které jsou z více než 90 % členy kmene Bacteroidetes a Firmicutes (72–74).

Grampozitivní kmen Firmicutes zahrnuje třídu Bacilli, Clostridia a Mollicutes. Mezi nejvíce zastoupené třídy patří Clostridia IV, IX a XIVa (75). Mezi převládající rody těchto tříd patří *Clostridium* (tvoří 95 % kmene Firmicutes), *Eubacterium*, *Roseburia* a *Ruminococcus*. Významnými producenty butyrátu jsou zejména *Eubacterium rectale* a *Roseburia* (Clostridium cluster IXa), které tvoří 5 – 10 % celkové mikrobioty (76, 77). 5 - 15 % mikrobioty zastupuje *Faecalibacterium prausnitzii* (Clostridium cluster IV) (78, 79).

Gramnegativní *Bacteroides* a *Prevotella* patří mezi nejvíce prostudované rody z kmene Bacteroidetes. Actinobacteria zahrnují rod *Bifidobacterium*, *Collinsella* a *Atopobium*, které patří mezi velmi důležité členy mikrobiální komunity (73, 80).

Další zástupci mikrobioty, kteří nejsou považováni za dominantní, jsou rozděleni do 7 kmenů: Cyanobacteria, Fusobacteria, Lentisphaerae, Proteobacteria, Spirochaetes, TM7 a Verrucomicrobia. Kmen Verrucomicrobia tvoří jeden druh *Akkermansia muciniphila*, který se podílí na degradaci mucinu (81). Přehled viz Tab. 1

**Tab 1.:** Fylogenetická distribuce lidských gastrointestinálních mikrobiálních fylotypů (82)

Kmen	Třída	Řád	Čeď
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Actinomycetaceae
			Corynebacteriaceae
			Micrococcaceae
			Propionibacteriaceae
		Bifidobacteriales	Bifidobacterium
		Coriobacteriales	Coriobacteriaceae
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Rikenellaceae
			Bacteroidaceae
			Prevotellaceae
			Phorphyromonadaceae
Cyanobacteria	Cyanobacteria	Chroococcales	Neklasifikováno
	Asteroleplasma	Asteroleplasmatales	Asteroleplasmataceae

*pokračování tabulky na další straně*

*pokračování tabulky z předchozí stránky*

Kmen	Třída	Řád	Čeleď
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae
			Staphylococcaceae
		Lactobacillales	Aerococcaceae
			Carnobacteriaceae
			Lactobacillaceae
			Leuconostocaceae
			Lactococcaceae
			Streptococcaceae
			Enterococcaceae
	Clostridia	Clostridiales	Clostridium cluster I
			Clostridium cluster III
			Clostridium cluster IV
			Clostridium cluster IX
			Clostridium cluster XI
			Clostridium cluster XIII
			Clostridium cluster XIVa
			Clostridium cluster XV
			Clostridium cluster XVI
			Clostridium cluster XVII
			Clostridium cluster XVIII
	Mollicutes	Neklasifikováno	
Proteobacteria	$\alpha$ -Proteobacteria	Rhizobiales	Neklasifikováno
		Sphingomonadales	Neklasifikováno
		Neklasifikováno	Alcaligenaceae
	$\beta$ -Proteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae
			Burkholderiaceae
	$\gamma$ -Proteobacteria	Aeromonadales	Aeromonadaceae
			Succinivibrionaceae
		Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
		Pasteurellales	Pasteurellaceae
		Pseudomonadales	Moraxellaceae
			Pseudomonadaceae
		Vibrionales	Vibrionaceae
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae
	$\delta$ -Proteobacteria	Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae
	$\epsilon$ -Proteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae
			Helicobacteraceae

*pokračování tabulky na další straně*

*pokračování tabulky z předchozí stránky*

Kmen	Třída	Řád	Čeleď
Fusobacteria	Fusobacteria	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae
Lentisphaerae	Lentisphaerae	Lentisphaerae	Lentisphaeraceae
Spirochaetes	Spirochaetes	Spirochaetales	Serpulinaceae
TM7	TM7	Neklasifikováno	
Verrucomicrobia	Verrucomicrobia	Vericomicrobiales	Vericomicrobiaceae
Euryarchaeota	Methanobacteria	Methanobacteriales	Methanobacteriaceae

GI trakt je kompartmentalizovaný systém, který je tvořen odlišnými anatomickými oblastmi v rozsahu od žaludku po rektum. Každá anatomická oblast je charakterizována různými fyzikálně chemickými vlastnostmi – rychlostí průchodu lumenálního obsahu, lokálním pH, redoxním potenciálem, dostupností sloučenin odvozených ze stravy a sekrecí hostitele (kyselina chlorovodíková, trávicí enzymy, žluč a hlen).

Složení a hojnost střevní mikrobioty se v různých oblastech střeva liší. Horní část GIT – žaludek, duodenum, jejunum obsahuje řídkou mikrobiotu, kde se koncentrace bakterií pohybuje okolo  $10^4$  bakterií/g tráveniny. Tato relativně nízká hojnost mikrobiální populace je způsobena poměrně agresivním prostředím žaludku (pH okolo 1 – 4,4) a následně žlučovými kyselinami a enzymy pankreatu uvolňovanými do dvanáctníku. Kromě toho je kolonizaci zabráněno rychlým tokem potravy, která způsobuje vymytí mikrobů. Koncentrace mikrobů se zvyšuje ke konci tenkého střeva, kde dosahuje množství  $10^7$  –  $10^8$  bakterií/g tráveniny. Největší koncentrace se nachází v distální části GIT, kde množství mikrobů dosahuje hodnot  $10^{12}$  bakterií/g stolice.

Zastoupení různých mikrobiálních populací souvisí nejen s různými anatomickými oblastmi, ale i s konkrétní lokalizací v jedné oblasti. Střevní lumen tvoří kontinuum s vnějším prostředím a od vnitřního prostředí je odděleno jedinou vrstvou střevních epitelálních buněk, která je pokryta vrstvou hlenu. Složení mikrobioty lumenálního povrchu se liší od složení epitelálních krypt pokrytých hlenem (78, 83).

*Bacteroidales*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Ruminococcus* jsou převládajícími rody ve střevním lumen, zatímco *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Akkermansia* převládají na povrchu sliznice (84). Kompozice jednou založené střevní mikrobioty (autochtonní) zůstává stabilní po celý dospělý život.

Mezi střevní mikrobiotou starších a mladších jedinců lze pozorovat některé rozdíly, zejména pokud jde o převahu *Bacteroides* a *Clostridium* u starších osob a Firmicutes u mladých dospělých (85). Na základě variace v hladinách jednoho ze tří rodů byly navrženy a klasifikovány enterotypy: *Bacteroides* (enterotyp 1), *Prevotella* (enterotyp 2) a *Ruminococcus* (enterotyp 3). Zdá se, že tyto tři varianty jsou nezávislé na indexu tělesné hmotnosti, věku, pohlaví nebo národnosti (86). Nicméně význam této klasifikace ve výzkumu či praxi je sporný (87).

## 2.10. Faktory, které ovlivňují složení střevní mikrobioty

V nejranějším období života ovlivňuje složení střevní mikrobioty vaginální a střevní mikrobiota matky, způsob porodu (vaginální vs. císařský řez) a strava (kojení vs. umělá výživa) (88, 89). Mezi další zevní faktory patří zejména vliv terapeutického ošetření, úroveň hygieny, expozice přirozenému prostředí, významný je i vliv genetického pozadí (90, 91). V dospělosti se nejčastěji uplatňují vliv potravin a jejich kontaminantů, prebiotika, probiotika a symbiotika, antibiotika a ostatní léčiva, zneužívání alkoholu. Mezi faktory, které se netýkají výživy, ale přesto mohou ve složení mikrobioty hrát roli, patří věk, pohlaví, psychický stres (7), gastrointestinální poruchy, životní styl, infekční a jiná onemocnění (92).

### 2.10.1. Genetický vliv

Genetický vliv byl studován u monozygotních a/nebo dizygotních dvojčat, u kterých byl prokázán vysoký stupeň podobnosti ve složení střevní mikrobioty ve srovnání s náhodnými navzájem nepříbuznými jedinci (90, 93).

### 2.10.2. Strava

Interakce stravy a mikrobioty GI traktu savců jsou extrémně složité a jsou výsledkem milionů let koevoluce mezi vyššími obratlovci a jejich specifickou mikrobiotou. Jakákoliv významná změna životního stylu a stravy ovlivní ekofyziologii celého GI traktu. V prvních fázích života vliv výživy (kojení/umělá výživa) významně ovlivňuje kolonizační vzorec. Ve složení střevní mikrobioty kojeného dítěte dominují bifidobakterie a bakterie mléčného kvašení, zatímco krmení počátečními kojeneckými mléky vede sice k rozmanitější komunitě, avšak s vyšším zastoupením oportunních patogenů. Jsou zde zastoupeny bifidobakterie, *Bacteroides*, klostridia a řady fakultativních anaerobů, jako jsou stafylokoky, streptokoky a *Enterobacteriaceae* (94, 95). Počet patogenních druhů, jako jsou *E. coli*, *Clostridium difficile* a některých druhů *Bacteroides fragilis*, je mnohem nižší u kojených dětí.

Zastoupení prospěšných mikrobů ve střevní mikrobiotě kojených dětí je přičítáno složení lidského mléka. Hlavními složkami mateřského mléka jsou oligosacharidy, které působí jako substráty fermentace v distálním úseku tlustého střeva a podporují růst bifidobakterií, a tím modulují imunitní systém kojence (96). Mateřské mléko je navíc samo o sobě zdrojem velkého množství bakterií ( $10^9$  mikrobů/l), což také může ovlivnit mikrobiální osídlení ve střevech kojených dětí (97). K velkému posunu ve složení střevní mikrobioty dochází vlivem zavádění pevné stravy dětem (94, 98).

Významný vliv na složení mikrobioty mají i geografické faktory a rozdíly ve stravování lidské populace. Ve stravě afrických dětí s převahou vlákniny byla nalezena zvýšená produkce SCFA ve srovnání se stravou evropských dětí se sníženým příjmem vlákniny, kde byla produkce SCFA nalezena jako výrazně nižší (95).

### 2.10.3. Antibiotika

Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje střevní ekosystém, je antibiotická terapie, která se běžně používá k odstranění nebo prevenci bakteriální kolonizace a způsobuje změny ve střevní mikrobiotě. Tyto změny přetrvávají dlouhou dobu i po přerušení léčby (98, 99-101). Hlavním dopadem antibiotické léčby je dlouhodobý pokles celkové rozmanitosti mikrobioty.

### 2.10.4. Věk

Lidská střevní mikrobiota se mění i vlivem stárnutí. Dlouhodobá medikace, především antibiotická léčba, snižuje fyziologické funkce mikrobioty. Střevní mikrobiotu starších lidí významně ovlivňují i změny v kvalitě a kvantitě potravy. Vzniklé změny jsou podobné tomu, co se děje v rané fázi našeho života. Nižší bakteriální diversita a zvýšení oportunních fakultativních aerobů (*Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Enterobacteriaceae*), snížení anaerobní mikrobioty, zejména u členů třídy Bacteroidetes a Clostridium třídy IV. a XIVa. Na rozdíl od kojenecké střevní mikrobioty je však pro seniorský věk typická nízká hladina bifidobakterií (102, 103).

### 2.10.5. Stravovací návyky

Nezdravé stravovací návyky negativně ovlivňují složení střevní mikrobioty a mohou působit jako faktor vyvolávající onemocnění s účinky na mnohé metabolické dráhy. Strava s vysokým obsahem tuků, polynenasycených mastných kyselin a masa je spojena se zvýšeným rizikem Crohnovy choroby a ulcerativní kolitidy (104). Riziko těchto zánětlivých střevních onemocnění (IBD) lze snížit modulací struktury střevní mikrobioty a/nebo jejího metabolomu například vegetariánskou stravou (105, 106). Kromě zánětlivých změn jsou změny ve složení střevní mikrobioty spojeny s rizikem vzniku rakoviny tlustého střeva a konečníku. Toto riziko pravděpodobně souvisí s konzumací stravy s hojným zastoupením červeného masa, která podporuje růst bakterií redukujících sírany, které patří mezi běžné komenzály střeva a produkují genotoxické látky (107–108). Naopak strava bohatá na vlákninu podporuje tvorbu SCFA, jako je butyrát, který je prospěšný pro lidské kolonocyty a má protinádorové vlastnosti (109).

Západní životní styl zahrnuje stravu s vysokým zastoupením živočišných bílkovin, nasycených tuků a jednoduchých cukrů, s nízkým zastoupením ovoce, zeleniny a vlákniny. Preference této stravy vede k vyššímu zastoupení *Bacteroides* druhů ve střevní mikrobiotě, zatímco strava bohatá na rostlinné polysacharidy je spojena s hojnějším zastoupením *Prevotella* druhů (110). Zvýšený příjem tučné stravy ovlivňuje homeostázu žlučových kyselin a tumorigenezi tlustého střeva. Střevní mikrobiota je schopna některé složky potravy metabolizovat a podílet se na přeměně primárních žlučových kyselin (cholová a chenodeoxycholová) na sekundární žlučové kyseliny (deoxycholová a lithocholová)

dehydroxylací uhlíku C-7. Tato metabolická transformace ovlivňuje enterohepatickou cirkulaci žlučových kyselin a absorpci tuků na úrovni tenkého střeva. Dysbióza projevující se kvantitativním snížením bakteriálních druhů podílejících se na metabolismu žlučových kyselin, významně snižuje poměr sekundární vs. primární žlučové kyseliny (111–112). Bylo prokázáno, že obézní jedinci, jejichž strava se vyznačuje vysokým zastoupením bílkovin a sacharidů, mají snížené množství SCFA a bifidobakterií (113).

### 2.11. Metabolická role střevní mikrobioty

V rámci zkoumání funkční rozmanitosti mikrobioty se ukázalo, že střevní metagenom přesahuje co do počtu genů až 150x genom lidský a doplňuje některé biochemické dráhy s enzymatickým aparátem, který není lidským genomem kódován (10, 72, 114, 115). Střevní mikrobiota se podílí na udržení střevní homeostázy, na obnově střevní epitelové vrstvy a na udržení její integrity. Podporuje střevní angiogenezi a upravuje střevní motilitu. Významný je i její vliv na funkci a vyhrávaní imunitního systému a ochranu proti patogenům (rezistence ke kolonizaci). Metabolické funkce spočívají především v uvolňování energie získané trávením komplexních vláken v potravě (škrob a vláknina), v produkci nutrientů (SCFA a aminokyselin), vitamínů K, B12, kyseliny listové, metabolismu xenobiotik a prokarcenogenů. Dále mikrobiota ovlivňuje vývoj nervového systému a reguluje apetit a vzorce jídelního chování.

Nutriční funkce střevní mikrobioty je spojena s fermentací nestravitelné vlákniny a anaerobní přeměnou peptidů, která vede k obnově metabolické energie hostitele a k udržení střevní homeostázy (116–118).

Na základě biochemického potenciálu je mikrobiota tlustého střeva považována za „metabolický orgán“ srovnatelný s biochemickým potenciálem jater, a to především díky využití nestravitelných polysacharidů, vzniku glykokonjugátů hostitele (mucin), dekonjugací a dehydroxylací žlučových kyselin, redukcí cholesterolu, biosyntézou vitamínů (K, B) a isoprenoidů, metabolismem aminokyselin a xenobiotik (119).

### 2.12. Mikrobiální fermentace

Zažívací trakt hostitele postrádá enzymatickou schopnost degradovat komplexní a nestravitelné polysacharidy (rezistentní škroby, nestravitelnou vlákninu a oligosacharidy), glykany produkované hostitelem (mucin, glykosfingolipidy) a některé proteiny ze stravy (120). V důsledku toho tyto složky potravy unikají trávení v tenkém střevě a pronikají do střeva tlustého, kde jsou fermentovány přítomnými mikroorganismy (121). Množství sacharidů v potravě vstupující do tlustého střeva se pohybuje v rozmezí 10 – 60 g/den. Za nejhojnější sacharid se považuje rezistentní škrob, následují nestravitelné polysacharidy a oligosacharidy, jako jsou laktóza, rafinóza, stachyóza apod. (77, 122). Tyto substráty se skládají z komplexního sortimentu makromolekul a jejich degradace vyžaduje řadu mikrobiálních hydrolytických enzymů produkovaných různými členy mikrobiální komunity. Kromě toho je při této přeměně komplexních sacharidů důležitá vzájemná spolupráce mikrobioty, která se uplatňuje prostřednictvím tzv. cross-feeding, během kterého jsou fermentační produkty uvolněné

jedním mikroorganismem využity jako růstové faktory pro jinou populaci (123).

Na základě využitého substrátu a tvorbě metabolitů lze rozlišit jednotlivé funkční skupiny v mikrobiotě tlustého střeva, viz Tab. 2.

**Tab. 2:** Metabolické vlastnosti členů lidské střevní mikrobioty (82)

Mikrobiální skupina	Druh	Metabolická funkce	Produkt metabolismu
Bacteroidetes	Bacteroidetes spp.	Štěpení polysacharidů; L-, S-	Acetát, propionát, sukcinát
	<i>Prevotella</i> spp.	Štěpení polysacharidů; L-, S-	Acetát, sukcinát, formiát
	<i>B. thetaiotaomicron</i>	Štěpení polysacharidů; L-, S-degradace mucinu	Acetát, propionát
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Metabolismus sacharidů	Acetát, laktát
	<i>B. longum</i>	Metabolismus sacharidů	Acetát, laktát, formiát, ethanol
	<i>B. bifidum</i>	Metabolismus sacharidů	Laktát, acetát, formiát
	<i>Collinsella</i>	Metabolismus sacharidů	Laktát, acetát, formiát
Clostridium cluster IV	<i>Ruminococcus bromii</i>	Metabolismus sacharidů	Acetát, formiát, H <sub>2</sub> , ethanol
	<i>R. flavefaciens</i>	Štěpení vlákniny	Acetát
	<i>F. prausnitzii</i>	Metabolismus sacharidů	Butyrát, D-laktát, formiát
Clostridium cluster XIVa	<i>R. intestinalis</i>	Metabolismus sacharidů	Butyrát, CO <sub>2</sub>
	<i>R. inulinovarans</i>	Metabolismus sacharidů	Butyrát, propionát
	<i>E. hallii</i>	Metabolismus sacharidů; A-, L-	Butyrát
	<i>A. caccae</i>	Metabolismus sacharidů; A-, L-	Butyrát, CO <sub>2</sub>
	<i>E. rectale</i>	Metabolismus sacharidů	Butyrát, laktát, formiát, H <sub>2</sub>
	<i>Coprococcus eutactus</i>	Metabolismus sacharidů; A-	Butyrát, formiát, laktát
	<i>Dorea longicatena</i>	Metabolismus sacharidů; A-	Formiát, acetát
Clostridium cluster IX	<i>Mitsuokella multacida</i>	Metabolismus kyseliny glukonové; A-	Butyrát
	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Metabolismus kyseliny glukonové; A-, L-	Butyrát, propionát
Proteobacteria	<i>Desulfovibrio</i> spp.	SRB; L-	Acetát, H <sub>2</sub> S
Verrucomicrobia	<i>Akkermansia muciniphila</i>	Degradace mucinu	Acetát, propionát
	<i>Vitriallis vadensis</i>	Degradace cellobiázy	Acetát
Archaea	<i>Methanobrevibacter</i> spp.	H <sub>2</sub> -utilizace	CH <sub>4</sub>

L- utilizace laktátu, S- utilizace sukcinátu, A- utilizace acetátu, SRB – sulfát redukující bakterie



Stále však chybí znalost klíčových mikroorganismů, které se podílejí na fermentaci ostatních sacharidů v tlustém střevě. Střevní bakterie druhu *Bacteroides* spp. a *Ruminococcus* spp. upřednostňují štěpení nerozpustných substrátů (124–126). Naopak oligosacharidy fruktooligosacharidy (FOS) a galaktoligosacharidy (GOS) a polysacharid inulin jsou přednostně fermentovány *Bifidobacterium* spp. a *Lactobacillus* spp.

Skupina bakterií, které patří do třídy Clostridium, patří mezi producenty butyrátu, který je jejich hlavním produktem fermentace (127, 128). Při syntéze butyrátu mohou být zapojeny různé fermentační cesty. Nejrozšířenější cestou, kterou tato třída využívá, je CoA transferázová. Méně běžná je cesta zahrnující aktivitu butyrát-kinázy (129). Třetí cesta využívá k produkci butyrátu D- a L-laktát (130). Také pro syntézu propionátu existují tři odlišné cesty. Sukcinát-dekarboxylázová, která je preferována *Bacteroides* spp. Akrylátovou cestu využívají Clostridium IX (131) a nedávno popsána propanediolová cesta je popsána u *Roseburia inulinivorans* (132).

Konečnými produkty mikrobiální fermentace jsou plyny – vodík, oxid uhličitý a methan, a SCFA jako produkty anaerobního metabolismu v tlustém střevě. Mezi obzvláště důležité patří butyrát, propionát a acetát, které mají základní roli ve fyziologii hostitele (133, 134).

#### 2.12.1. Fyziologický efekt produktů mikrobiální fermentace

Metabolity mikrobioty, konečné produkty mikrobiálního metabolismu, se rozdělují na ty, které jsou závislé na dietě a vznikají štěpením živin přijatých potravou, a na ty, které jsou na dietě nezávislé, tj. vznikají štěpením endogenních sloučenin. Signály z mikrobiálních metabolitů ovlivňují imunitní zrání, imunitní homeostázu, energetický metabolismus hostitele a podílejí se na udržování integrity střevní sliznice. Mezi základní tři metabolity patří SCFA, produkty metabolismu žlučových kyselin a molekuly tryptofanu. Mikrobiální metabolity jsou detekovatelné v širokém okruhu biologických tkání zahrnující stolicí, moč, sérum a cerebrospinální tekutinu (135).

##### 2.12.1.1. SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem)

SCFA vznikají fermentací nestavitelných polysacharidů anaerobními komenzálními bakteriemi (136). Mezi nejvíce prostudované patří butyrát, propionát a acetát. Jejich poměrné zastoupení se liší v závislosti na stravě. Acetát, který je produkován širokým spektrem bakterií, tvoří přibližně 50 – 70 %, propionát produkován především kmeny Bacteroidetes a Firmicutes představuje 10 – 20 % a butyrát, který je produkován malým počtem třídy Clostridia, představuje zbylou část produkce.

SCFA (především butyrát) slouží nejen jako zdroj energie pro střevní mikrobiotu a intraepiteliální buňky, ale podílí se také na udržení integrity střevní mukózní vrstvy regulací funkce pohárkových buněk (137). U zvířecích modelů byl prokázán jejich protektivní vliv při vzniku kolitidy a v regulaci množství střevních makrofágů. Prokázán byl i jejich centrální vliv na řízení příjmu potravy, akumulaci tukové tkáně a modulaci střevní motility.

Kromě přímého účinku na buňky epitelové vrstvy modulují tyto mikrobiální metabolity vrozenou i adaptivní imunitu. Butyrát působí jako histon deacetylázový inhibitor, který podporuje protizánětlivý fenotypový projev buněk. Exprese receptoru GPR43 (s G-proteinem spřažený receptor 43), který je aktivován SCFA, se ukazuje jako důležitá pro chemotaxi neutrofilů (138). Protizánětlivý efekt SCFA jako inhibitoru HDAC (histon deacetylázy) byl prokázán jak u makrofágů, tak i u dendritických buněk. Studie Macia et al. (2015) poukazuje na to, že podání stravy s vysokým podílem vlákniny nebo přímé podání acetátu myším zvýšilo aktivitu inflamazomu a vzestup hladiny IL-18, který se podílí na reparaci epitelové vrstvy a zmírňuje závažnost střevní kolitidy (139). Jako významný se ukázal i vliv SCFA na modulaci buněk adaptivní imunity. SCFA se podílejí především na diferenciaci Treg lymfocytů a produkci IL-10 a uplatňují antiproliferativní efekt na nádorové buňky (140).

Ochrany střevních epitelových buněk (IEC) se SCFA účastní dvěma způsoby. První spočívá ve vazbě SCFA na s G-proteinem spřažený receptor GPR43 na povrchu epitelových buněk, který vede k následné ERK fosforylaci (ERK-extracelulárně regulovaná kináza) a NLRP3 aktivaci (NLRP3-pyrinová doména obsahující protein 3), která prostřednictvím produkce IL-18 vede ke zvýšení integrity IEC.

Ve druhém případě SCFA butyrát působí jako inhibitor HDAC a spouští expresi mnoha genů, včetně produkce antiapoptotického BCL-2 a JAM proteinu. Výsledkem je pokles apoptózy IEC a vzestupu mezibuněčné integrity a ochrany IEC buněk (141).

SCFA, které se liší různou délkou uhlíkových řetězců – acetát (C2), propionát (C3), butyrát (C4), valerát (C5) a kaproát (C6), se tvoří v různém množství v závislosti na příjmu živin a složení střevní mikrobioty hostitele. Koncentrace SCFA v proximálním úseku tlustého střeva kolísá od hodnot 137 do 197 mmol/kg chymu a 86 – 97 mmol/kg chymu v distálním úseku střeva. Poměr zastoupení SCFA pro C2:C3:C4:C5:C6 je přibližně 54:20:21:4:1 (142, 143). SCFA se rychle absorbují a pouze 5 – 10 % se vylučuje do stolice (144). Produkce SCFA vede ke snížení lumenálního pH, zvýšení mikrobiální biomasy a fekálního objemu a ke změně mikrobiální kompozice, zejména stimulace prospěšných bakterií včetně bifidobakterií a laktobacilů (145). SCFA stimuluje proliferaci mukózních buněk, produkci hlenu a průtok krve mukózou, a tím ovlivňuje periferní metabolismus.

Butyrát je důležitým zdrojem energie pro střevní epitel a pro prevenci vzniku rakoviny tlustého střeva (146–149). Aplikace butyrátu v tlustém střevě vede také ke sníženému vnímání viscerální bolesti (150).

Acetát, který je využit jako substrát pro tvorbu cholesterolu a mastných kyselin v játrech, zvyšuje průtok krve v tlustém střevě a absorpci kyslíku a zvyšuje motilitu ilea ovlivněním jeho kontrakcí (134).

Propionát je lépe absorbován z tlustého střeva než acetát a může působit jako substrát pro glukoneogenezi v játrech. Jak acetát, tak propionát se podílejí na prevenci rozvoje tumoru jater i jiných druhů rakoviny, které metastazují do jater (např. rakovina prsu a tlustého střeva) (151).

Fyziologii hostitele ovlivňují i formiát, sukcinát a laktát, které se také uvolňují do

lumen střeva v rámci mikrobiální přeměny sacharidů (152, 153).

Po anaerobní přeměně v proximálním úseku tlustého střeva se trávenina pohybuje směrem do distálního úseku tlustého střeva. Během této pasáže klesá dostupnost sacharidů, zatímco proteiny a aminokyseliny se stávají hlavním zdrojem energie pro mikrobiotu distálního úseku střeva (143). Tlusté střevo je tak významným místem intenzivního zpracování proteinů (154). Mezi důležité proteolytické druhy patří *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* a *Lactobacillus* (155). Denně do tlustého střeva vstupuje přibližně 13 g bílkovin. Kromě toho jsou další zdroje proteinu v tlustém střevě poskytovány endogenním materiálem, jakými jsou například pankreatické enzymy, hlen, odloučené epiteliální buňky. V tlustém střevě jsou dusíkaté zbytky nejdříve depolymerizovány pankreatickými endopeptidázami, bakteriálními proteázami a peptidázami (156), které tvoří krátké peptidy a uvolňují aminokyseliny pro fermentaci. Kromě SCFA, vodíku a CO<sub>2</sub> se během fermentace proteinů produkují mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem (isobutyrát, isovalerát, 2- methylbutyrát a další organické kyseliny). Dalšími uvolněnými složkami jsou amoniak, aminy, fenoly a indoly. Fermentace proteinů je spojena se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny tlustého střeva, pravděpodobně v důsledku produkce mastných kyselin s rozvětveným řetězcem a potenciálně toxických metabolitů (aminy, fenoly a thioly) (156, 157). Souvislost mezi fermentací proteinů a rakovinou je podpořena tím, že většinou postihne distální úsek střeva, kde tato fermentace probíhá (155). Příjem pomalu fermentovatelných sacharidů by mohl vést k prospěšné sacharolytické aktivitě a ke snížení fermentace proteinů (158). Během anaerobní fermentace sacharidů a proteinů je produkován molekulární vodík (H<sub>2</sub>), který je odstraněn mikrobiotou tlustého střeva.

Existují tři hlavní cesty zpracování H<sub>2</sub>. H<sub>2</sub> může sloužit jako regulátor růstu pro methanogeny tlustého střeva – *Methanobrevibacter smithii* a *Methanosphaera stadtmanae*, které produkují methan (CH<sub>4</sub>) jako konečný produkt H<sub>2</sub> oxidace. V přítomnosti síranů a mucinů se uplatňují bakterie redukující sírany (SRB) kmene Proteobacteria, které překonají methanogenní mikroby a oxidují H<sub>2</sub> za vzniku sirovodíku (H<sub>2</sub>S). Pokud je zvýšená zásoba síranu v oblasti tlustého střeva, budou dominovat SRB, zatímco za podmínek, které omezují produkci síranu, budou převažovat methanogenní a acetogenní populace. Acetogeny (kmen Verrucomicrobia) redukcí CO<sub>2</sub> eliminují H<sub>2</sub> za vzniku acetátu. H<sub>2</sub>, který není využit střevní mikrobiotou, je z tlustého střeva odstraněn průchodem střevní stěnou do krve, odkud je transportován do plic a poté vyloučen dechem. Měření vydechovaného H<sub>2</sub> je tak dobrým indikátorem mikrobiální fermentace v tlustém střevě (159, 160).

#### 2.12.1.2. Žlučové kyseliny a mikrobiota

Žlučové kyseliny (ŽK) jsou malé molekuly, které jsou pomocí multienzymatického procesu tvořeny v játrech z cholesterolu. V játrech jsou také konjugovány s taurinem nebo glycinem. Produktem této konjugace jsou primární žlučové kyseliny – cholová a chenodeoxycholová. Tyto primární žlučové kyseliny mají amfipatický charakter a podílejí se na trávení a absorpci tuků v tenkém střevě. 95 % primárních žlučových kyselin je v distálním

ileu zpětně resorbováno do jater (enterohepatální oběh). Tento proces je kontrolován fibroblastovým růstovým faktorem 19 (FGF 19), který se uvolňuje v okamžiku, kdy se žlučové kyseliny navážou na farnesoidní X receptor (FXR) enterocytů (161). Kromě regulace své vlastní syntézy ovlivňují žlučové kyseliny některé metabolické a imunitní procesy prostřednictvím jejich vazby na mnohé receptory. Kromě zmíněného FXR receptoru jsou schopny vazby na transmembránový TGR 5 receptor, pregnanový X receptor (PXR) androstenový receptor a vitamin D receptor (ve střevě pomáhá chránit sliznici před kancerogenními a zánětlivými účinky sekundárních ŽK, protože zvyšuje aktivitu enzymů, hydroxylujících a sulfatujících tyto ŽK). Prostřednictvím TGR 5 receptoru zlepšují ŽK insulinovou senzitivitu, energetický výdej ze svalu a hnědé tukové tkáně a relaxaci žlučníku. Vazba na TGR5 receptor také redukuje množství Kupfferových buněk v odpovědi na lipopolysacharid. Aktivace FXR receptoru uplatňuje různorodý efekt na metabolismus – např. redukcí lipogeneze, jaterní glukoneogeneze, regeneraci jater a produkci antimikrobiálních peptidů (162).

Popsán je také jak účinek některých mikrobiálních druhů na žlučové kyseliny, tak i vliv žlučových kyselin na mikrobiotu. Prostřednictvím enzymu hydrolázy, která je společná mnoha bakteriálním druhům, dochází k dekonjugaci primárních žlučových kyselin a jejich pasivní reabsorpci ve střevě. Pomocí enzymů 7alfa/beta dehydroxylázy (společných některým klostridiálním druhům) jsou primární ŽK konvertovány na sekundární ŽK – deoxycholovou (DCA) a lithocholovou (LCA) (162).

Žlučové kyseliny mohou ovlivňovat složení a denzitu střevní mikrobioty. Aktivací FXR receptoru v tenkém střevě je inhibováno bakteriální přerůstání a translokace bakterií (163, 164). Primární ŽK vykazují přímý antimikrobiální efekt, jak bylo popsáno u druhů *Bifidobacterium breve* a *Lactobacillus salivarius*, ale i nepřímý efekt stimulací produkce antimikrobiálních peptidů, jakými jsou cathelicidin, angiogenin I a syntáza oxidu dusnatého. Sekundární žlučové kyseliny se mohou podílet na rezistenci ke kolonizaci zejména u infekcí způsobených *Clostridium difficile* (CDI) (165).

Dysbióza, která je popisována u stavů zánětlivého onemocnění střeva nebo v případě resekce střeva, vede ke ztrátě hydrolázové aktivity, k poruchám dekonjugace, ke snížené reabsorpci primárních ŽK, k poruchám transformace a desulfatace sekundárních ŽK ovlivňujících významně výslednou změnu profilů primárních a sekundárních ŽK a je spojena s výskytem kolorektálního karcinomu u lidí a hepatocelulárního karcinomu, jak bylo prokázáno ve studii u obézních myší (166, 167).

### 2.12.1.3. Tryptofan

Tryptofan je esenciální aromatická aminokyselina, jejíž příjem musí být satureován potravou. Mezi zdroje tryptofanu patří kuřecí maso, ryby, oves a mléčné produkty. Tryptofan je prekursor syntézy mnoha důležitých bioaktivních molekul, jakými jsou serotonin, melatonin, nikotinamid a některé další. Centrálním místem metabolismu tryptofanu je GIT.

Tryptofan může být metabolizován třemi cestami. Dvě cesty (kynureninová a

serotoninová) jsou uskutečňovány hostitelem. Třetí cesta (indolová) je zprostředkovávána mikrobiotou (135). Velká část tryptofanu přijatého potravou je metabolizována kynureninovou cestou a je limitována přítomností enzymu indolamin-2,3-dioxygenázy 1, který se nachází ve slizničních a imunitních buňkách a tryptofan-2,3-dioxygenázou přítomnou v játrech (168). Druhá cesta metabolizace je serotoninová. Ta je limitována enzymem tryptofanhydroxylázou 1, která je součástí enterochromaffinních buněk (169). Třetí způsob metabolizace tryptofanu je prostřednictvím mikrobioty za vzniku indolových derivátů (indol-3-aldehydu, indol-3-acetaldehydu, indolacetové kyseliny, indolakrylové kyseliny a indolepropionové kyseliny (IPA)).

Některé z těchto derivátů působí jako ligandy AhR receptoru, který jako transkripční faktor prostřednictvím produkce IL-22 uplatňuje ochranný a protizánětlivý efekt na střevní sliznici (170). Mikrobiální osídlení a imunotolerance proximální části tenkého střeva jsou tímto závislé na tvorbě AhR ligandů z přijaté stravy (171). Komenzální laktobacily využívají tryptofan ke tvorbě AhR ligandu, indol-3-aldehydu (172).

Aryl uhlovodíkové receptory jsou ligandem aktivované transkripční faktory a modulátory slizniční imunitní odpovědi. Indolem aktivovaný AhR receptor je kritický pro udržení střevní epitelové bariéry. Jeho deficit u myši vede k bakteriálnímu přerůstání a k poklesu produkce AMP intraepiteliálními buňkami (171). AhR receptory se podílejí i na regulaci vrozené imunitní odpovědi. Například zelenina z čeledi brukvovitých, která je metabolizována mikrobiotou za vzniku indolu, vede k jeho aktivaci, a tím se podílí na zesílení integrity epitelové vrstvy a na zmírnění projevů zánětu (173).

## 2.13. Role probiotik ve vztahu k mikrobiotě

Jako probiotika označujeme prospěšné mikroorganismy, které přijímáme potravou. Jejich základní vlastností je schopnost přežít agresivní prostředí žaludku a schopnost přechodně se množit a kolonizovat střevo člověka. Tyto zdravé prospěšné mikroorganismy v interakci se střevní mikrobiotou potlačují růst patogenních bakterií. Podporují tvorbu SCFA a podílejí se na posílení bariérové funkce střevní sliznice. Modulují slizniční a zprostředkovaně i systémovou imunitu. Produkují řadu prozánětlivých cytokinů a dusíkatých metabolitů, ovlivňují diferenciaci T-lymfocytů do subtypu Th1, Th 17 a Treg, a tím se podílejí na rozvoji obranného zánětu organismu (4).

Mezi probiotické druhy patří například *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. reuterii*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* a dále *Saccharomyces boulardii* a *Bifidobacterium bifidum* (4).

### 2.13.1. Pozitivní účinky probiotik

#### 2.13.1.1. Modulace buněčné a humorálně zprostředkované imunitní odpovědi

Jak se ukázalo, některá probiotika zvyšují fagocytózu nebo aktivitu NK buněk a mají

schopnost přímo integrovat s dendritickými buňkami. Některé probiotické kmeny regulují protilátkovou odpověď na přítomnost patogenů. Zároveň zvyšují hladinu protizánětlivých cytokinů (TNF), a zmírňují tak důsledky zánětlivých onemocnění střeva (174).

#### 2.13.1.2. *Produkce organických kyselin*

Probiotické druhy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* produkují kyselinu mléčnou a octovou jako konečný produkt metabolismu sacharidů. Produkci těchto organických kyselin snižují pH ve střevním lumen, a brání tak přerůstání patogenů (175–177). *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* neprodukuje butyrát, ale v přítomnosti komenzální mikrobioty, například *Faecalibacterium*, se hladina butyrátu a jiných SCFA může zvyšovat v rámci cross-feedingu, kdy produkt metabolismu jednoho kmene může být využit ve výživě jiného kmene (178).

#### 2.13.1.3. *Interakce se střevní mikrobiotou*

Probiotické kmeny mohou interagovat se střevní mikrobiotou kompeticí o živiny, antagonismem, bakteriálním cross-feedingem, a podílet se tak na podpoře mikrobiální stability (179). Mnoho probiotických kmenů je antagonistických vůči ostatním mikroorganismům. Prostřednictvím produkce organických kyselin a bakteriocinů působí proti patogenům, které jsou přítomny ve střevním traktu (180).

#### 2.13.1.4. *Vzájemná interakce mezi hostitelem a probiotiky*

Interakce mezi probiotiky a hostitelem je zprostředkována makromolekulami, zejména proteiny (mucin vázající protein, pily, LPxTG vázající protein) na povrchu buněk střevních, imunitních a dendritických, ale i neproteinovými komponenty (lipoteichová kyselina, peptidoglykan a exopolysacharidy) (180). Ukazuje se, že výše zmíněné struktury ovlivňují vazbu mikroorganismů na povrch těchto buněk, což vede ke zvýšení tranzitních časů a zlepšení integrity bariérové vrstvy (181). *Lactobacillus rhamnosus* GG ke své interakci se střevem využívá střevní pily. *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* zvyšují expresi tight-junction proteinů. Některé další kmeny zlepšují bariérové funkce prostřednictvím regulace genů, které řídí produkci mucinu, a tím ovlivňují případnou vazbu patogenů na epitelové buňky (182, 183).

#### 2.13.1.5. *Produkce nízkomolekulárních látek*

Dále byla popsána produkce malých molekul některými probiotickými kmeny s odlišným efektem na hostitele a na jeho mikrobiotu. Mezi nejvíce prostudované patří produkce neurotransmiterů, jako jsou oxytocin, kyselina gamaaminomáselná, serotonin, tryptamin, noradrenalin, dopamin a acetylcholin (184–186).

#### 2.13.1.6. Produkce enzymů

Prokázána byla i produkce mikrobiálních enzymů jako jsou beta-galaktosidáza a hydroláza žlučových solí, které jsou produkovány některými probiotickými kmeny (187, 188). Zlepšují trávení laktózy a regulují hladinu lipidů v krvi. Druh *Streptococcus thermophilus* v jogurtech usnadňuje trávení laktózy, a může tak být klinickým benefitem u osob s laktózovou intolerancí (187).

#### 2.14. Role prebiotik ve vztahu k mikrobiotě

Jako prebiotika označujeme nestravitelné oligosacharidy, které jsou přítomny ve stravě rostlinného původu a jsou důležité pro rozvoj a udržení fyziologické mikrobioty. Prvním zdrojem prebiotických oligosacharidů je mateřské mléko. Z rostlinné stravy mezi hlavními zdroji patří česnek, cibule, většina druhů zeleniny a ovoce, luštěniny a celozrnná mouka. Mezi prebiotikum patří inulin, který se nachází v kořeni čekanky a jeho enzymatickou hydrolýzou jsou získávány fruktooligosacharidy fruktany. Dalšími průmyslově vyrobenými prebiotiky jsou galaktooligosacharidy, které se vyrábějí z laktózy za použití beta-galaktosidázy. Mikroorganismy fyziologické mikrobioty využívají více fruktany. Naopak skupiny mikroorganismů z rodu *Clostridium* a *Bacteroides* nejsou těmito prebiotiky stimulovány (4).

Prebiotika jsou nezbytnou součástí komplexního funkčního ekosystému působení probiotik. Neboli – role prebiotik je nezbytná pro účinné uplatnění probiotik (188–190).

Prebiotický efekt mají především polysacharidy, ale i další substráty, jako jsou polyfenoly nebo polynenasycené mastné kyseliny (191). Nízkomolekulární sacharidy jsou velmi efektivně metabolizovány mikroorganismy jako např. bifidobakteriemi, které prostřednictvím glykosidáz a specifických transportních systémů umožňují rychlé vstřebávání nízkomolekulárních cukrů (191, 192). Někteří další členové rodu *Bacteroides* jsou adaptováni na štěpení vysokomolekulárních polysacharidů (193, 194). *Ruminococcus* spp. mohou usnadňovat štěpení škrobů (195) a uvolněné dextriny jsou dále metabolizovány mikrobiální komunitou. Cesta od využití polysacharidů ke tvorbě SCFA je výsledkem nepřímé a komplexní odpovědi metabolismu. Acetát a laktát produkované bifidobakteriemi a bakteriemi mléčného kvašení jsou využity dalšími mikroorganismy k produkci propionátu a butyrátu (196, 197).

Komplikací při studování účinku odpovědi mikrobiálního ekosystému na přítomnost polysacharidů je skutečnost, že jsou ovlivněny již přítomnými mikroorganismy. V případě dominance rodu *Prevotella* jsou polysacharidy fermentovány mnohem rychleji, než pokud dominuje rod *Bacteroides* (198). Stejně tak se lišilo spektrum SCFA po inokulaci druhů *Prevotella* nebo *Bacteroides* prebiotickými FOS nebo dvěma odlišnými arabinoxylany. Kultura s dominancí *Prevotella* produkovala vyšší poměr propionátu k acetátu a butyrátu než kultura s převahou *Bacteroides* (199).

#### 2.14.1. Mechanismy působení prebiotik na zdraví hostitele

Mechanismy, kterými prebiotika ovlivňují zdraví hostitele, jsou popsány s použitím metod *in vitro* nebo *in vivo* na zvířecích modelech. Mezi prokázané patří:

##### 2.14.1.1. *Obrana proti patogenům*

Jak bylo uvedeno, u probiotik vede produkce organických kyselin prostřednictvím fermentace prebiotik ke snížení pH a inhibuje přerůstání bakterií. Ve studii, která byla tvořena starší lidskou populací, bylo denní podávání GOS po dobu deseti týdnů spojeno se zlepšením imunitních funkcí, především zesílení aktivity fagocytózy a NK buněk (200, 201).

##### 2.14.1.2. *Imunitní modulace*

Ačkoliv mechanismus není zcela znám, intervence prebiotiky může redukovat počet Th2 buněk, které se účastní alergických reakcí. Podáním GOS nebo FOS u kojenců bylo spojeno se sníženým výskytem atopické dermatitidy oproti skupině dětí bez užití této prebiotické formule (202).

##### 2.14.1.3. *Zvyšování absorpce minerálů*

Snížování pH prostřednictvím produkce SCFA vede ke zvýšení rozpustnosti kalcia, a tím i ke zlepšení jeho pasivního vychytávání. Rozpustnost mnoha kalciových solí v suplementech a ve stravě je závislá na počátečním pH, a tím je limitována i jeho dostupnost (203).

##### 2.14.1.4. *Metabolický efekt SCFA*

Konzumací prebiotické vlákniny a následnou tvorbou SCFA je ovlivněna hladina hormonů, které modulují střevní motilitu. Produkované SCFA zlepšují bariérové funkce ve střevech. Zamezují přestupu zánětlivých mediátorů, jako je lipopolysacharid bakterií, ze střeva do systémové cirkulace (204).

Významný je i efekt SCFA na pocit nasycení. Podílí se na regulaci lipolýzy, glukoneogeneze a na uvolnění anorexigenně působícího GLP-1 a hormonu leptinu (205, 206).



### 3. Transplantace hematopoetických buněk

#### 3.1. Hematopoetická kmenová buňka (HC)

Hematopoetická kmenová buňka se vyznačuje schopností sebeobnovy, možností velkého počtu opakovaného dělení a aktivací diferenčních programů, díky kterým vznikají všechny druhy myeloidní (erytrocyty, granulocyty, monocyty, žírné buňky, makrofágy, megakaryocyty a trombocyty) i lymfoidní (T- a B-lymfocyty, NK) vývojové řady. Diferenciací kmenových buněk vznikají buňky progenitorové, které mají omezenou schopnost sebe reprodukce a jsou závislé na přísunu buněk kmenových. Buňky progenitorové se diferencují v prekurzory krevních buněk. Velká část kmenových buněk se nachází v proliferačně klidovém G0 stavu. Tvorba krevních buněk je umožněna především proliferační aktivitou buněk progenitorových. Aktivita kmenových i progenitorových buněk je závislá na působení prostředí, ve kterém se nacházejí. Existují rozdílné niky pro buňky kmenové, které udržují buňky v klidovém stavu, a pro buňky progenitorové, které podporují růst a diferenciaci. Pro hematopoetické kmenové buňky je takovým místem osteoblastová nika trámčité kosti. Ta je tvořena specializovanými osteoblasty a dalšími buňkami, které mají schopnost vázat kmenové buňky i produkovat extracelulární matrix (207). Perivaskulární nika, která se nachází v blízkosti sinusoid kostní dřeně, obsahuje progenitorové hematopoetické buňky, které pod vlivem četných chemokinů proliferují.

Hematopoetické kmenové i progenitorové buňky mohou být získány pro účely transplantace z kostní dřeně, periferní krve, pupečnickové krve a z fetálních jater. Transplantované kmenové a progenitorové buňky musí rozpoznat hematopoetickou tkáň, uchytit se k endotelu sinusoid, překonat endotel a nalézt svou niku, aby mohly zahájit tvorbu progenitorů nebo prekurzorů krevních buněk (engraftment).

#### 3.2. Transplantace hematopoetických buněk (HSCT)

Hlavním důvodem pro transplantaci kmenových buněk jsou maligní hematologická onemocnění. Mezi nejčastější indikace k transplantaci patří akutní lymfoblastová leukémie (ALL) a akutní myeloidní leukémie (AML), dále myelodysplastický syndrom, mnohočetný myelom a lymfomy, vzácněji útlumy kostní dřeně či některé typy imunodeficiencí. Transplantace kmenových buněk může být autologní, při které jsou použity vlastní kmenové buňky pacienta, nebo alogenní, kdy se jedná o převod kmenových buněk od vhodného dárce (4).

Zdrojem pluripotentních kmenových buněk krvetvorby je kostní dřeň, periferní nebo pupečnicková krev. Periferní hematopoetické buňky jsou stále přítomny v periferní krvi, ale jejich koncentrace je velmi nízká. Vlastnímu odběru proto musí předcházet jejich mobilizace z kostní dřeně do krevního oběhu pomocí růstového faktoru stimulující kolonie granulocytů (G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor) (207).

Pacienti před převodem kostní dřeně nebo kmenových buněk získaných z periferní krve podstupují několikadenní chemoterapii, někdy i v kombinaci s celotělovým ozářením, které mají za cíl zničení nemocné kostní dřeně.

Transplantace kmenových buněk probíhá intravenózní cestou. Kmenové buňky pronikají skrze endotelový prostor krevní cirkulace a kostní dřeně a v průběhu přibližně dvou týdnů dochází k produkci buněk jednotlivých krevních řad.

Přestože počet buněk vrozené imunity se zpravidla normalizuje již během několika týdnů, jejich funkce se plně vyvine až v průběhu několika měsíců. NK buňky se vyvíjejí pomaleji než myeloidní buňky, jejich počet a funkce dosáhne obvyklých hodnot během 2 až 3 měsíců. Složky adaptivní imunity se obnovují nejpomaleji. Počty B-lymfocytů árcovského původu dosahují velmi nízkých hodnot a normalizují se v průběhu 1 až 3 let po zákroku. Oproti tomu protilátky příjemce přetrvávají řadu let po transplantaci. V případě T-lymfocytů zpočátku dominují T-lymfocyty dárce a postupně dochází k jejich aktivaci a klonální expanzi, která je zodpovědná za přijetí nebo odmítnutí transplantátu a za zvládnutí případné infekce. Maturace nových T-lymfocytů získaných transplantací prekursorových buněk projde thymem příjemce a získá alotoleranci. Obnova počtu a funkce CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> buněk trvá řádově rok až desítky let (4).

### 3.3. Přípravné režimy

Přípravné režimy, které jsou pacientům podávány v rámci předtransplantační přípravy, mají za cíl umožnit přijetí transplantátu a současně se uplatňuje i jejich imunosupresivní a protinádorový efekt. Tzv. myeloablativní režim vede k úplné ablaci kostní dřeně, má vyšší protinádorovou účinnost, ale zároveň vyšší toxicitu. Režimy s redukovanou intenzitou (RIC) jsou vhodné pro nemocné vyššího věku nebo s přidruženým orgánovým poškozením, mají však nižší protinádorový účinek, a riziko relapsu je tedy vyšší. Imunosupresivní účinek přípravného režimu je důležitý především jako prevence rejekce štěpu hostitelskými buňkami. Riziko rejekce stoupá v případě neshody v HLA systému. Imunosuprese není nutná u autologní transplantace (207).

### 3.4. Komplikace HSCT v souvislosti se střevní mikrobiotou

Základní buněčnou linii zodpovědnou za úspěšnost transplantace představují T-lymfocyty. Mezi jejich vlastnosti patří rozpoznání cizí a vlastní tkáně. Této schopnosti nabývají při vyžívání v thymu. Hlavní komponentou, která napomáhá tomuto rozlišování, je HLA antigenní systém. HLA představuje lidskou variantu hlavního histokompatibilního systému (MHC), která byla porvé popsána na leukocytech. MHC se vyskytuje na všech jaderných buňkách vyšších živočichů. Jedná se o povrchové glykoproteiny, jejichž funkcí je navázání antigenních peptidů na své vazebné místo a prezentování těchto peptidů T-lymfocytům. Tím se MHC glykoproteiny podílejí na aktivaci specifické imunitní odpovědi.

Kromě HLA systému je pro transplantaci kmenových buněk důležitá i přítomnost vedlejších histokompatibilních antigenů (MiHA). Jedná se o malé peptidy o 10 – 20 AMK,

kteřé jsou kódovány geny napříč celým genomem. Jde o polymorfismy, často SNP (záměna jednoho nukleotidu), které mohou být příčinou chronického odvržení transplantované tkáně (rejekce), a to i u geneticky shodných jedinců – jednovaječných dvojčat. Nejznámější MiHA jsou spojovány s chromosomem Y. Rejekce tedy může být vyvolána u jedinců odlišného pohlaví, konkrétně imunitní systém ženy rozpozná tyto peptidy a může vyvolat aloreaktivitu. V průběhu aloreaktivní reakce T-lymfocyty příjemce rozpoznávají transplantované buňky dárce nejdříve cestou přímou, kdy pomocí svých TcR receptorů rozpoznají antigenní peptidy ve vazbě s HLA antigeny na dendritických buňkách dárce. Postupně počet buněk, které jsou schopny prezentovat antigen v transplantátu, ubývá a nastupuje cesta nepřímá, při které jsou nejprve antigeny dárce v komplexu s HLA antigeny pohlceny antigen prezentujícími buňkami příjemce (opět se jedná především o dendritické buňky), následně jsou buňkou zpracovány a prezentovány T-lymfocytům příjemce (4).

Rozpoznání alogenních peptidů spolu s HLA molekulami je hlavní podmínkou pro rozvoj imunitní odpovědi příjemce proti tkáni dárce. MiHA antigeny jsou také často příčinou vzniku závažné komplikace GVHD (reakce štěpu proti hostiteli) u transplantovaných pacientů. Na druhou stranu neshoda v MiHA antigenech potencuje žádoucí reakci GvL (reakce štěpu proti leukémii). GvL je specifickým typem GvT reakce (reakce štěpu proti tumoru). GvL reakce se účastní T-lymfocyty dárce, a to především cytotoxické CD8<sup>+</sup> společně s NK buňkami. Při této reakci jsou rozpoznány zbylé nádorové buňky příjemce a jsou likvidovány rekonstituovaným imunitním systémem dárce (207).

#### 3.4.1. Reakce štěpu proti hostiteli (GVHD)

Vlastní imunitní systém příjemce je v průběhu transplantace hematopoetických buněk eliminován a příjemce získává prekurzorové buňky krvetvorby i imunitního systému od dárce. V případě, že přítomné T-lymfocyty dárce rozpoznají cílové struktury na tkáních příjemce, vyvolají imunitní reakci, která vede k poškození orgánů příjemce. Tato reakce je závažnou komplikací transplantace hematopoetických buněk i solidních orgánů a tkání a nazývá se reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Jedná se o třístupňový proces.

V první fázi dochází k poškození tkáně příjemce v důsledku agresivní kondicionační terapie nutné jako prevence relapsu malignity a odmítnutí štěpu.

Druhá fáze zahrnuje aktivaci lymfocytů hostitelskými a později dárcovskými antigeny prezentujícími buňkami, kdy aktivované CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty (Th lymfocyty) získávají efektorové funkce a produkují cytokiny, které urychlují imunitní reakci. Dříve se zdálo, že v patogenezi GVHD jsou rozhodující Th1 lymfocyty s produkcí INF- $\gamma$ , postupně se ukázal významný vliv Th2 i Th17 lymfocytů s produkcí IL4 a IL17 (3, 4).

Třetí stupeň souvisí s aktivací efektorových cytotoxických T-lymfocytů CD8<sup>+</sup> (Tc) indukujících přímé poškození cílových buněk a navozujících typické poškození orgánů (játra, kůže a střeva).

Pro vývoj této komplikace je nejčastější příčinou neshoda v hlavních nebo vedlejších histokompatibilních systémech a současné poškození organismu příjemce chemoterapií a

ozařováním, které podstupuje před transplantací. V první fázi dochází k aktivaci dendritických buněk příjemce cestou DAMP signálů z poškozených buněk. Dendritické buňky tyto antigenní peptidy zpracují a prezentují je na svých površích společně se svými HLA molekulami. Dárcovské T-lymfocyty prostřednictvím svých TcR receptorů rozpoznají tyto signály, aktivují se přednostně do subtypů Th1 a Th17 a podporují aktivaci NK buněk a cytotoxických CD8<sup>+</sup> lymfocytů, což následně vede k poškození tkání a orgánů příjemce. Rozvojem zánětlivé reakce jsou nejvíce postiženy orgány zažívacího traktu a kůže (207).

Orgánem často zasaženým GVHD je střevo. Jeho postižení je výsledkem toxicity přípravného režimu a imunitní aktivace spojené s poškozením kmenových buněk spolu s Panethovými a pohárkovými buňkami ve střevní sliznici (208). Tyto změny vedou ke zvýšené propustnosti střeva, zánětlivým změnám a k redukci sliznice (209). Další příčinou poškození GIT je intenzivní antibiotická léčba, které jsou pacienti vystaveni v rámci předtransplantačních režimů. Dopad střevní mikrobioty na vznik GVHD byl zkoumán již v 70. letech na myších modelech, kdy u germ-free myší (bez mikroorganismů) byla prokázána snížená tendence k vývoji střevního GVHD (210).

Pozdější studie poukázaly na spojitost GVHD s vývojem specifické dysbiózy, která se vyznačuje zvýšením řádu Enterobacterales a snížením obligátních anaerobních bakterií z řádu Clostridiales (211–213). Údaje zjištěné u pediatrických i dospělých pacientů ukázaly na pokles hojnosti rodu *Faecalibacterium* z řádu Clostridiales a vyšší procento rodu *Enterococcus* u pacientů, u nichž se vyvinula střevní GVHD. *Enterococcus* bakterie mají potenciál zvýšit rozvoj střevního zánětu produkcí IL-1 a IL-6 a následnou aktivací subtypů Th1 a Th17 lymfocytů (214). Jenq et al. (215) poukázali na sníženou letalitu v souvislosti s GVHD u pacientů, kteří mají hojně zastoupen rod *Blautia* z řádu Clostridiales, který přispívá k udržení protizánětlivého prostředí ve střevech. Významnou roli ve vývoji střevní GVHD představují Panethovy buňky, které se sekrecí alfa defensinů podílejí na ochraně střevní sliznice před nekomenzálními bakteriemi. Panethovy buňky jsou přímo zasaženy vývojem GVHD a jejich destrukce způsobuje pokles alfa defensinů a podporuje růst patogenní *E. coli*, která je často příčinou septikémie a podílí se na dalším rozvoji střevní GVHD (212, 216).

Také se ukázalo, že pacienti, kteří nevyvinou GVHD mají v porovnání s pacienty s GVHD hojněji zastoupeny bakteriální skupiny, které jsou producenty SCFA (např. Bacteroidetes s produkcí propionátu, *Blautia* s produkcí acetátu). SCFA jsou dobře prostudované produkty, které vznikají bakteriální fermentací polysacharidů a které nemohou lidé dostatečně trávit z důvodu nedostatku glykosidových hydroláz v lidském genomu. SCFA prokázaly rozmanitou škálu imunomodulačních funkcí, lokálně i systémově a jsou jedním z nejjasnějších příkladů toho, jak stravování a zpracování živin mikrobiotou ovlivňuje imunitní odpověď (136, 217). V souvislosti s tím bylo také zjištěno, že u pacientů s GVHD se vyvíjí podobný vzorec dysbiózy jako u pacientů s chronickým zánětlivým onemocněním střev, který naznačuje možnou souvislost mezi mikrobiomem a rozvojem autoimunitního onemocnění (83).

### 3.4.2. Relaps onemocnění

Úzká interakce mezi střevní mikrobiotou a imunitním systémem, která byla v posledních 15 letech zkoumána a popsána, poukázala také na možnou souvislost mezi stavem střevní mikrobioty a relapsem onemocnění u pacientů, kteří podstupují transplantaci.

V retrospektivní studii Peled et al. (2017) popsali hojnost jednotlivých druhů mikrobioty u 541 pacientů podstupujících HSCT. Zaměřili se na vztah mezi střevní mikrobiotou a mírou relapsu/progrese onemocnění v období dvou let po HSCT. Ukázalo se, že vyšší početnost některých bakteriálních skupin a hojnější zastoupení zejména některých z nich (*Eubacterium limosum*) bylo spojeno se sníženým rizikem relapsu/progrese onemocnění. Tato data také naznačují, že hojnost nebo přítomnost některých skupin bakterií by mohla sloužit jako potencionální biomarker rizika relapsu u pacientů po HSCT (218).

### 3.4.3. Infekční komplikace

V období po transplantaci hematopoetických buněk jsou pacienti, především v důsledku dlouhodobé granulocytopenie, ohroženi vznikem oportunních infekcí.

Granulocytopenie je definována jako pokles neutrofilních granulocytů  $< 0,5 \times 10^9/l$ . Jako febrilní neutropenie se označuje stav, kdy se u granulocytopenického pacienta objeví febrilie  $> 38,3^\circ\text{C}$  naměřená jednorázově nebo trvající  $> 1$  hod (207).

Původcem infekce u většiny pacientů jsou kolonizující mikroorganismy, méně často jde o mikroorganismy získané z okolí. V první fázi jsou nejčastějšími vyvolavateli bakterie, později se mohou přidružit infekce způsobené viry nebo kvasinkami jako důsledek použité širokospektré antibiotické léčby (207). Mezi nejčastější vyvolavatele patří  $G^+$  bakterie, které tvoří 70 až 80 % bakteriálních infekcí. Prvotním místem infekce je nejčastěji GI trakt, vedlejší dutiny nosní, plíce nebo kůže. V průběhu protinádorové léčby jsou často narušeny střevní epitelové buňky, které umožní komenzálům prostoupit do submukózní vrstvy, a dostat se tak do krevního oběhu. V důsledku toho jsou pacienti po transplantaci ohroženi bakteriálními systémovými infekcemi. Ukázalo se, že u pacientů se systémovými infekcemi krevního řečiště, které jsou způsobeny *E.coli* a *Klebsiella pneumoniae*, je souběžně těmito organismy kolonizováno i střevo, což naznačuje, že poškozené střevo může být primárním zdrojem infekce (219). V roce 2012 Taur et al. pozorovali výrazné posuny ve složení střevní mikrobioty u dvou třetin z 94 pacientů po HSCT s převahou vancomycin-rezistentního rodu *Streptococcus*, rodu *Enterococcus* nebo aerobních  $G^-$  bakterií patřících do kmene Proteobacteria. Ukázalo se, že tento posun ve střevní mikrobiotě opět může předcházet infekci krevního řečiště (220). Ford et al. (2017) ve své studii uvádí, že kolonizace vancomycin-rezistentním kmenem *Enterococcus* nebo  $G^-$  bakteriemi není v období před transplantací spojena se stoupajícím rizikem mortality v souvislosti s HSCT, ale se zvýšeným rizikem vzniku bakteremie. V období engraftmentu (přihojení štěpu) je však osídlení touto bakterií spojeno s nárůstem mortality pravděpodobně v souvislosti s výskytem GVHD a/nebo s relapsem onemocnění (221).

#### 3.4.4. Plicní komplikace

V důsledku zvýšené střevní permeability a modifikace mikrobiomu dochází u některých pacientů v období engraftmentu k translokaci bakterií nebo jejich částí (lipopolysacharidů) do plic, kde mohou způsobit akutní poškození plic a syndrom respirační tísně spojený se sepsí. Harris et al. (2016) zkoumali roli mikrobiomu v souvislosti s vývojem plicního onemocnění u pacientů po HSCT. U 66 alotransplantovaných pacientů našli příznaky související s mortalitou. Mezi tyto příznaky patřily: vysoký index komorbidit, expozice fluorochinolonom, nízká výchozí diversita a dominance grammaproteobakterií ve střevní mikrobiotě jako prediktorů vzniku plicních komplikací. Grammaproteobakterie patří do třídy bakterií, které zahrnují respirační patogeny jako je *Klebsiella pneumoniae*. Tato zjištění poukazují na možnost přímé translokace bakterií do plic během časného období po transplantaci nebo nepřímé poškození plic způsobené stimulací zánětlivé odpovědi mikrobiotou (222).

### 3.5. Faktory ovlivňující průběh onemocnění a přežití

#### 3.5.1. Vliv mikrobiální diversity

Zdraví jedinci mají rozmanité zastoupení střevní mikrobioty, která přednostně zahrnuje členy kmene Firmicutes a Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia a Fusobacteria (79). V průběhu alo-HSCT rozmanitost střevní mikrobioty prudce klesá. Pacienti jsou z důvodu neutropenie provázející první týdny po alo-HSCT vystaveni profylaktickým a terapeutickým dávkám antibiotik, které snížením bakteriální diversity způsobují vyšší náchylnost k infekcím (220, 223). Zatímco mikrobiota zdravých jedinců je tvořena tisíci odlišných druhů (10, 224), pro pacienty po alo-HSCT je typická monodominance jen některého z druhů kmene Firmicutes – *Enterococcus* nebo *Streptococcus* (220). Vedle antibiotické léčby je rychlá změna diversity způsobena též rozvojem střevního zánětu a změnou ve stravování pacienta. U mnohých pacientů dochází ke ztrátě chuti k jídlu, která je podpořena přípravným režimem, chemoterapií a rozvojem GVHD (225, 226). V retrospektivní studii, která byla provedena u 80 pacientů, se ukázalo, že v období engraftmentu byla nízká diversita střevního mikrobiomu spojena se signifikantním nárůstem mortality (52 %) ve srovnání s těmi, kteří vykazovali vysokou diversitu střevní mikrobioty (8 %) (227). S vyšší mortalitou bylo spojeno především hojně zastoupení grammaproteobakterií (zahrnující čeleď *Enterobacteriaceae*), zatímco vyšší zastoupení *Lachnospiraceae* a *Actinomycetaceae* se ukázalo jako příznivější (227).

Expozice antibiotiku vancomycinu a/nebo metronidazolu je spojena s monodominancí *Enterococcus* (220, 228). Monodominance rodu *Enterococcus* nebo třídy Proteobacteria zvyšuje riziko rozvoje bakteremie (220). Oproti tomu použití fluorochinolonových antibiotik (ciprofloxacinu nebo levofloxacinu) riziko rozvoje dominance proteobakteriemi snižuje (220). Antibiotická léčba může také zvýšit citlivost vůči infekci způsobené *Clostridium difficile*. Její vznik u pacientů po alo-HSCT podporují i další faktory – imunosuprese, chemoterapie a

ozařování (229, 230). Naopak zastoupení *Clostridium scindens* může přispět k vytvoření rezistence proti *C. difficile* tím, že podporuje tvorbu sekundárních žlučových kyselin (231). Jedná se o příklad rezistence ke kolonizaci u příjemců alo-HSCT.

### 3.5.2. Vliv výživy

Souvislost mezi výživou a mikrobiotou ve vztahu k lidskému zdraví byla detailně popsána v několika studiích (232–234). Vliv parenterální výživy (PV) a hladovění na střevní ekosystém u pacientů podstupujících HSCT nebyl zatím příliš zkoumán. Avšak ve studiích, které se zabývaly vlivem hladovění na střevní mikrobiotu u pacientů s mentální anorexií se ukázalo, že hladovění snižuje mikrobiální rozmanitost a použití parenterální výživy po dobu delší než 10 dnů je spojeno se ztrátou komenzálních druhů rodu *Blautia* (235, 236). Kromě toho podání parenterální výživy podporuje vývoj střevní slizniční atrofie, bakteriální translokaci a mění produkci SCFA mikrobiotou (215, 237). Ačkoliv neexistují studie, které by srovnávaly složení mikrobioty u pacientů po alo-HSCT, kteří dostávali pouze enterální nebo pouze parenterální výživu, některá klinická data ukazují, že použití enterální výživy (EV) je spojeno s lepšími výsledky ve vztahu k přežití, přítomnosti infekce a rozvoji akutního GVHD (238–242).

V důsledku přípravného režimu se u mnoha pacientů vyvine nauzea, mukositida a anorexie, které vedou ke zhoršení nutričního stavu v prvním týdnu po alo-HSCT. Zhoršený nutriční stav po alo-HSCT je negativním prognostickým faktorem (243).

V roce 2009 společnosti pro výživu ASPEN a ESPEN vydaly pokyny pro nutriční podporu u pacientů podstupujících HSCT (244–246). V rámci těchto pokynů bylo doporučeno podání EV jako možnost první volby před PV z důvodu vyššího rizika nežádoucích účinků (např. systémových infekcí a metabolických komplikací). PV by měla být podána pacientům v případě těžké mukositidy (> 3. stupně) a při stavu celkového selhání GIT. Tato doporučení byla podpořena nezávislou metaanalýzou organizace Cochrane zveřejněnou v roce 2008 (247). V současné době existuje široká variabilita ve využití mezinárodních doporučení, které se týkají výživy pacientů podstupujících transplantaci (248–250). Mnoho center nemá vytvořenou standardizovanou strategii nutriční podpory pro tyto pacienty.

V systematickém přehledu literatury od roku 2009 do roku 2015 se autoři zaměřili na tři hlavní témata ve vztahu ke klinickému stavu pacientů: vliv podvýživy, vliv nutričních intervencí a role neutropenické diety. Podvýživa byla hodnocena podle hodnoty BMI a úbytku hmotnosti. Ukázalo se, že většina pacientů je i přes indukční (předoperační) chemoterapii v období před transplantací v dobrém nutričním stavu a že hmotnostní úbytek během HSCT dosahuje 5 – 10 % hmotnosti před transplantací. Dále byl hodnocen negativní dopad podvýživy (definován pomocí BMI < 18,5 kg/m<sup>2</sup>) na klinické výsledky a zejména na délku celkového přežití (OS – overall survival) (251–255).

Některé z dalších studií se zabývaly hodnocením podání EV a PV pacientům po alo-HSCT. Seguy et al. (2012) uvádí u skupiny pacientů, kterým byla podána EV (61 pacientů ze 121) lepší klinické výsledky s ohledem na OS, engraftment neutrofilů a vývoj akutní GVHD

(256). Ve studii Guieze et al. (2014) bylo použití EV spojeno s nižší dobou trvání febrilií, s nižší potřebou antimykotické terapie a se sníženou potřebou výměny centrálního žilního katétru. U obou studií nebyl prokázán vliv na snížení úmrtnosti do 100 dnů po transplantaci (240).

Ve stejné době byla také hodnocena jedna retrospektivní observační studie, která hodnotila účinek neutropenické stravy na klinický stav pacientů po HSCT. Studie porovnávala stav pacientů, kteří dostávali neutropenickou dietu (úplné vyloučení čerstvého ovoce a zeleniny, syrového a nedostatečně tepelně upraveného masa a sýrů, uzených ryb, syrových obilných výrobků nebo nepasterizovaných mléčných výrobků) a stav pacientů, kteří přešli z neutropenické stravy na modifikovanou nemocniční stravu, kde čelili pouze menším dietním omezením (vyloučení nevařených ryb a masa, nepasterizovaných mléčných výrobků). Autoři této studie uvedli výrazně více mikrobiologicky potvrzených infekcí u pacientů, kteří dostávali neutropenickou dietu během hospitalizace a zejména po zotavení z neutropenie. Častější byly především infekce močových cest a GIT (vancomycin-rezistentní *Enterococcus faecium*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium difficile*) (257).

Celková parenterální výživa (TPN) je k nutriční podpoře u HSCT pacientů široce využívána (258, 259). Její dopad na mikrobiotu transplantovaných pacientů nebyl doposud detailně prozkoumán, především z etického hlediska je stále věcí diskuse, jestli by měl být orální příjem preferován před parenterálním jako prevence poškození mikrobioty u GVHD pacientů (247, 260). Přínos udržení perorálního příjmu před celkovou parenterální výživou je v udržení funkce gastrointestinálního traktu a v ochraně bariérových funkcí sliznic. Dvě malé studie poukazují na to, že podání TPN bylo spojeno s vyšším výskytem akutní GVHD a horším přežitím (242, 261). V jiné retrospektivní studii provedené u alo-HSCT pacientů bylo podávání TPN po dobu delší než 10 dnů spojeno s poklesem rodu *Blautia* (215). Otázkou srovnání použití EV a PV u pacientů s GVHD se zabývá randomizovaná studie z roku 2016. Studie je zaměřena na výzkum souvislostí mezi použitím systémové enterální a parenterální výživy a její vliv na snížení rizika GVHD (III. a IV. stupně) a na výskyt infekčních příhod v souvislosti se snížením časné mortality (den +100) u pacientů po HSCT. Autoři této studie poukazují na skutečnost neustálého vývoje myeloablativních režimů, které mají oproti původním sníženou toxicitou a tím i sníženou úmrtnost po transplantaci (den +100) o přibližně 10 % od dob, kdy byla tato studie původně navržena. Předpokládaná snížená toxicita ve skupině pacientů s PV může vést k nedostatečné statistické schopnosti prokázat nadřazenost EV (262).

### 3.5.3. Vliv antibiotické léčby

Zjištění, že vyšší bakteriální diversita je spojena s lepším celkovým přežitím u pacientů po alo-HSCT, vyvolalo otázky související s běžnou antibiotickou bakteriální dekontaminací střeva u příjemců HSCT (262). Počáteční studie, které byly provedeny na myších a později i na lidech, ukázaly, že střevní dekontaminace širokospektrými antibiotiky a použití metody filtrace proudícího vzduchu, snížilo výskyt akutního GVHD (210, 264).

Následné randomizované studie, které se zabývaly účinky metronidazolu a ciproflaxacinu jako antibakteriální profylaxe prokázaly, že jejich použití vedlo k redukci výskytu GVHD. Retrospektivní studií z roku 2017 bylo u 15 pediatrických pacientů zjištěno, že použití



antibiotik proti anaerobním bakteriím vedlo naopak k signifikantnímu vzestupu GVHD spojeného s úbytkem protizánětlivých klostridií (265). Další retrospektivní studie prokázala u 500 pacientů z Kanadského centra, že antibiotická dekontaminace střeva před alo-HSCT vede k vyšší incidenci výskytu II. – IV. stupně GVHD (265). Jedním z vysvětlení tohoto nálezu je dle autorů vznik enterokokové infekce rezistentní na antibiotika, která může značně znesnadňovat úspěšnost střevní dekontaminace.

Weber et al. (2015) se ve své studii zaměřili na porovnání dekontaminace střev pomocí antibiotik ciprofloxacinu a metronidazolu v porovnání s použitím samostatného rifaximu, který patří mezi nevstřebatelné širokospektré antibiotikum indikované při zánětlivém onemocnění střev (267). Ve skupině léčené rifaximem byl zjištěn snížený výskyt GVHD a mortalita v souvislosti s transplantací s odstupem jednoho roku. Dále bylo významně zvýšeno celkové přežití s menší enterokokovou zátěží a zvýšené koncentrace 3-indoxyl sulfátu v moči. Kromě toho léčba infekčních komplikací dalšími systémovými antibiotiky nesnížila příznivé účinky rifaximinu na složení střevní mikrobioty a na výsledky HSCT (267). Tato studie a další prokázaly, že odlišné skupiny antibiotik mohou mít různý dopad na složení střevní mikrobioty a na klinické výsledky. Antibiotika vancomycin a metronidazol, která jsou účinná v boji proti anaerobům, jsou spojena s dominancí *Enterococcus*, zatímco použití fluorochinolonů snižuje riziko dominance proteobakterií (228). Clindamycin, látka účinná proti anaerobním bakteriím, zvyšuje riziko GVHD především tím, že způsobí významnou depleci protizánětlivých klostridií (265). Opakované expozice derivátům penicilinu a karbapenemu byly spojeny s vyšším výskytem střevní GVHD (268). Stejně tak použití antibiotik piperacilin/tazobactam a imipinem/cilastatin byly spojeny se zvýšeným výskytem, závažností a mortalitou v souvislosti se střevní GVHD. Piperacilin/tazobactam vede k redukci *Bacteroidetes* a *Lactobacillus* (269). Výskyt akutní GVHD byl také signifikantně vyšší u pacientů, kteří užívali cefalosporiny čtvrté generace (269). Na druhou stranu antibiotika, která chrání anaerobní komenzální bakterie, jako jsou azatreonam nebo cefepim, vedou ke snížení úmrtnosti v souvislosti s GVHD (270).

Všechna tato zjištění poukazují na skutečnost, že použití antibiotik šetřících anaerobní bakterie může potencionálně snížit riziko vzniku střevního GVHD. V souvislosti s tím probíhají různé modulace léčby antibiotiky s úzkým spektrem účinku, změny v načasování a trvání terapie.

### 3.6. Možnosti modifikace střevní mikrobioty a její diagnostické využití u pacientů podstupujících HSCT

#### 3.6.1. Probiotické a prebiotické strategie u pacientů po alo-HSCT

Modifikace střevní mikrobioty pomocí některých výživových strategií byla studována zejména na jiných souborech probandů, než u pacientů podstupujících HSCT, nicméně některá data existují. Jedná se především o podávání prebiotik, například inulinu, FOS, GOS, xylooligosacharidů nebo bramborového škrobu. Tavit et al. (2012) použili stravu bohatší na

vlákninu u pacientů v období před HSCT, která byla spojena s dřívějším engraftmentem a kratší dobou febrilní neutropenie (271). Retrospektivní studie Lyame et al. (2014) hodnotila suplementaci prebiotiky v období HSCT. Ukázalo se, že preventivní podávání glutaminu, vlákniny a oligosacharidů snižuje příznaky mírného a středního postižení střev a je spojeno s lepším přežitím ke dni +100. Konkrétně se jednalo o snížení závažnosti mukozitidy, potřeby parenterální výživy a úbytku hmotnosti, snížení bakteriální translokace druhu *Enterococcus* a v souvislosti s tím i snížení gastrointestinálního postižení sliznice (272).

Literatura uvádí dvě studie zaměřené na použití jednotlivých kmenů mikroorganismů. Gorshein et al. (2017) zahájili randomizovanou studii, ve které byl pacientům po alo-HSCT suplementován druh *Lactobacillus rhamnosus* GG. Při této studii se neprokázal žádný významný vliv na složení střevní mikrobioty nebo na ochranu před GVHD (273). Sharma et al. (2017) ve své studii použili preventivní podávání pastilek obsahujících *Lactobacillus brevis* CD2, které pravděpodobně snižovaly výskyt, trvání a závažnost mukozitidy (274). Počet studií je však omezen a stále existují určité obavy, které se týkají bezpečnosti při podávání živých mikroorganismů imunokompromitovaným pacientům.

### 3.6.2. FMT – transplantace střevní mikrobioty

Přestože antibiotická léčba poškozuje mikrobiotu a zvyšuje riziko střevní infekce u pacientů podstupujících alogenní transplantaci hematopoetických buněk, antibiotika se rutinně podávají za účelem léčby nebo snížení rizika závažnosti infekce. Prospektivní studie u pacientů podstupujících alo-HSCT ukázala, že střevní mikrobiota se během léčby širokospektrými antibiotiky výrazně mění, dominuje především ztráta anaerobních bakterií včetně imunomodulačních druhů třídy Clostridia a Bacteroidetes (220). Ztráta těchto anaerobů koreluje s výskytem komplikací, mezi které patří systémová infekce vancomycin-rezistentním enterokokem (VRE), infekce způsobené *Clostridium difficile* a rozvoj GVHD. Pacienti, kteří ztrácejí diverzitu střevních mikrobiot v době engraftmentu, mají vyšší výskyt úmrtí v souvislosti s transplantací (275).

Od roku 2009 se Taur et al. zabývá změnami složení střevní mikrobioty v souvislosti s alo-HSCT. Na základě analýzy vzorků stolice od 753 pacientů v rozmezí dnů -25 před transplantací a +100 den po transplantaci byla inverzním Simpsonovým indexem (SI) vyjádřena průměrná diversita střevní mikrobioty, která byla zpočátku vysoká, ale postupně klesala s použitím profylaktické nebo empirické léčby antibiotiky. Nejnížší hodnoty byly zaznamenány okolo dne +5 a tento stav přetrvával po dobu asi 6 týdnů. U mnohých pacientů přetrvávala nízká diversita mikrobioty i v období engraftmentu. Předchozí studie také ukázaly, že úmrtnost je vyšší u pacientů s nízkou diversitou SI < 4 v době engraftmentu. Mezi 753 pacienty v tomto období byla zjištěna diversita < 4 u 39 % pacientů a < 2 u 25 % pacientů. Průměrně se střevní mikrobiota začala obnovovat okolo dne +50, ale fekální vzorky shromážděné až do dne +100 zřídka vykazovaly obnovení diversity před alokací HSCT (275). Na základě těchto poznatků byla zahájena otevřená kontrolovaná randomizovaná studie rekonstituce střevní mikrobioty pomocí metody auto-FMT s cílem určit proveditelnost, bezpečnost a účinnost postupu pro rekonstituci střevní mikrobioty (276).

Prvních 25 hodnocených pacientů (14 z léčené skupiny a 11 ze skupiny kontrolní), u kterých došlo k disrupci mikrobioty v důsledku antibiotické léčby a u kterých byla v den +21 prokázána monodominance rodu *Enterococcus*, bylo indikováno k provedení auto FMT v den +49 po transplantaci. Následné vzorky stolice prokázaly navrácení střevní mikrobioty na úroveň před transplantací z hlediska rozmanitosti i podobnosti složení. Dále se ukázalo, že komenzální skupiny, jako jsou *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* a *Bacteroidetes* byly úspěšně obnoveny. Tato pokračující studie i přes své limity prokázala, že postup auto-FMT byl dobře tolerován a účinně obnovil komenzální bakteriální populace u pacientů v kritickém časném stádiu imunitní rekonstituce po alogene HSCT (276).

Transplantace fekální mikrobioty spočívá v infuzi fekální hmoty od zdravého dárce do gastrointestinálního traktu pacienta s dysbiotickou střevní mikrobiotou. Zdrojem fekálního materiálu může být i sám pacient. U pacientů, kteří dostávají autologní FMT, by vzorky stolice měly být odebrány v době klinické anamnézy v relativně dobrém zdravotním stavu.

Někteří autoři považují FMT za „konečná probiotika“, která přímo upravují složení střevního mikrobiomu hostitele vedoucí k obnovení eubiosy a střevní homeostázy (277–279).

V souvislosti s FMT je řešeno několik praktických otázek. U pacientů, kteří dostávají FMT od dárce, je řešena volba mezi příbuzným a nepříbuzným dárce. Z důvodu genetické podobnosti a sdíleného prostředí, může mít příbuzný dárce genetické složení FMT blíže příjemci. FMT vzorky lze shromažďovat a ukládat zmražené a použít kdykoliv v případě potřeby (278, 279). Screening dárců je klíčovým faktorem bezpečnosti postupu, aby se předešlo potencionálně přenosným iatrogenním infekčním chorobám (277). Přestože je FMT ve svých obecných vlastnostech velmi jednoduchá, vyžaduje v některých ohledech stejnou péči, jaká je nutná při transplantaci jiných orgánů. U vybraného dárce je nutné provést veškerou analýzu určenou k vyhodnocení rizika přenosu jakékoli infekční choroby. Podle protokolů, které se v současné době provádějí, je každý dárce podroben odběru krve a stolice 4 – 5 dní před odběrem stolice, aby se potvrdila negativita viru hepatitidy A, B, C, HIV, *Treponema pallidum*, *C. difficile* a běžných patogenních GIT bakterií a parazitů (280). Kromě toho by měl být hodnocen eubiotický stav fekálního mikrobiálního ekosystému dárce buď druhově specifickou qPCR nebo sekvenováním nové generace (NGS). Nevhodný výběr dárců by mohl vystavit příjemce řadě rizik, včetně změny nutričního stavu a tělesné hmotnosti, změny absorpce živin, získání některých chronických onemocnění, obezity, diabetu a kardiovaskulárních onemocnění včetně nespecifických střevních zánětů (IBD), přičemž většina těchto onemocnění je spojena s dysbiotickým stavem střevní mikrobioty (281–284).

Existují různé způsoby podání fekálního transplantátu – kolonoskopie, esofago-gastro-duodenoskopie, podání nasogastrickou nebo nasoduodenální sondou, klystýrem a orální tobolkou. Žádná z forem neprokázala jasnou nadřazenost (285). Přínosem perorální tobolky pro pacienta je nejmenší invazivita, nevýhodou je potřeba velkého množství tobolek k dosažení potřebné mikrobiální zátěže (286).

V literatuře se uvádí případy užití FMT preventivně za účelem snížení rizika dysbiózy a růstu bakteriálních kmenů rezistentních na antibiotika. Blinski et al. (2017) léčili pacienty s poruchami krve, 40 % neutropenických a 8 % s GVHD, kteří byli kolonizováni bakteriemi

rezistentními na antibiotika. Pacienti podstoupili FMT nasoduodenální sondou od nepříbuzných dárců. 60 % pacientů dosáhlo úplné dekolonizace rezistentních druhů 1 měsíc po FMT (287).

FMT lze použít s terapeutickým cílem, v souvislosti s recidivujícími infekcemi *Clostridium difficile* (recurrent *C.difficile* infection – rCDI) i jako prostředek druhé léčebné linie u akutní GVHD střeva. Neemen et al. (2012) a De Gastro (2015) ve svých studiích publikovali dvě kazuistiky, které se týkaly úspěšné léčby rCDI o FMT cestou podání nasojejunální sondy. Jedna FMT byla provedena od příbuzného dárce a druhá od dvou nepříbuzných dárců. V obou případech bylo dosaženo remise bez nepříznivých účinků (288, 289). Webb et al. (2016) publikovali studii, ve které 7 příjemců HSCT podstoupilo FMT od nepříbuzného dárce. 5 pacientů užívalo imunosupresivní léčbu. Transplantace byla provedena nasojejunální sondou nebo kolonoskopií. 6 pacientů nemělo recidivu. Jeden pacient podstoupil další FMT k dosažení remise (290). FMT byla zkoumána také jako potenciální terapeutická strategie u pacientů s GVHD, která je refrakterní na léčbu steroidy. Kakihana et al. (2016) provedli FMT od příbuzného dárce cestou nasoduodenální sondy u čtyř pacientů s GVHD rezistentním na steroidy v odstupu 92 dnů po HSCT. Úplná odpověď na transplantaci byla pozorována u tří pacientů. Zlepšení GIT příznaků bylo pozorováno během několika dnů a ve třech případech bylo nutné podání FMT zopakovat (291). Spindelboeck et al. (2017) informovali o použití od příbuzných i nepříbuzných dárců v případě tří pacientů s refrakterní střevní GVHD čtvrtého stupně. Dva pacienti dosáhli po vícenásobné FMT úplné remise. Jeden pacient vykazoval po jednom cyklu FMT nadále GVHD I. stupně (292). Studie Qi et al. (2018) se týkala 8 pacientů s refrakterní GVHD IV. stupně, kteří dostali jeden nebo dva cykly FMT od nepříbuzných dárců nasoduodenální sondou. U 5 pacientů bylo dosaženo remise bez relapsu. Všech 8 pacientů dosáhlo vyššího stupně přežití bez progresu ve srovnání s kontrolní skupinou (293).

FMT patří mezi nové léčebné strategie, a přestože jsou zmíněné případy považovány za bezpečné, stále existují určité obavy, které se týkají podávání živých mikrorganismů imunokompromitovaným pacientům se změněnou propustností střeva (294, 295).

U imunokompromitovaných pacientů jsou v popředí zájmu také studie, které se zabývají podáváním bakteriálních metabolitů namísto kompletních bakterií. Metody zahrnují podání SCFA, například butyrátu nebo jeho analogů, nebo sekundárních žlučových kyselin k potlačení *C. difficile* infekcí. V pilotní studii o pěti pacientech s rekurentními infekcemi *C. difficile* přineslo potencionální výhodu podání sterilního fekálního filtrátu, což je bezpečnější metoda než FMT. Sterilní fekální filtrát se získá ze stolice postupem sterilní filtrace za účelem odstranění malých částic a bakterií. Výsledek obsahuje bakteriální zbytky, proteiny, antimikrobiální sloučeniny, metabolické produkty a oligonukleotidy/DNA spíše než neporušené mikroorganismy, které se ukázaly jako účinné při léčbě rCDI (296).

### 3.6.3. Diagnostika stavu mikrobioty

Detailně studované změny ve složení mikrobioty u pacientů s GVHD a v souvislosti s relapsem onemocnění po alo-HSCT poukazují na možnost využití některých produktů bakterií jako diagnostických nebo prognostických biomarkerů. Ve studii Rayes (2015) navrhuje genotypizaci fukosyltransferázy 2 (FUT2), pomocí které by mohlo být určeno riziko rozvoje GVHD a bakteriální translokace u pacientů po alo-HSCT (297). FUT2 gen řídí produkci enzymu, který je zodpovědný za syntézu H antigenu v tělních tekutinách a na střevní sliznici (298). Slizniční ABH antigeny jsou sacharidové povahy a slouží jako zdroj energie pro mnohé bakterie a také jako adhezivní receptory pro mikroby (299, 300), a podílejí se tak na formování střevní mikrobioty. Mutace FUT2 genu (428G > A) znamená, že okolo 25 % Kavkazanů, kteří mají genotyp AA neexprimují ABH antigeny v mucinové vrstvě. Nositelé tohoto genotypu jsou označováni jako nesekretoři (301, 302). Ukázalo se, že nesekretoři jsou více ohroženi rizikem rozvoje bakteremie, pravděpodobně z důvodu redukované slizniční vrstvy, která představuje první ochranou linií pro přestup bakterií slizniční vrstvou do krve. Riziko rozvoje akutní GVHD se naopak u této skupiny ukázalo jako nižší. Důvodem je pravděpodobně vyšší zastoupení některých specifických skupin bakterií, které je spojeny s protizánětlivým působením například produkcí SCFA (297).

Mezi další vhodný indikátor pro určení stavu mikrobioty patří stanovení hladiny 3-indoxyl sulfátu v moči. Některé střevní komenzální bakterie jsou schopny prostřednictvím enzymu tryptofanázy štěpit L-tryptofan za vzniku indolu. Hlavní konjugát indolu, který lze prokázat v moči, se nazývá 3-indoxyl sulfát (3-IS). Rodiny Firmicutes (*Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*) byly shledány jako významní producenti 3-IS, zatímco členové řádu Lactobacillales a Bacillales byly nalezeny u pacientů s nízkou hladinou 3-IS. Ukázalo se, že nízká hladina 3-IS v moči pacientů v období +0 až +10 po alo-HSCT je asociována se sníženým krátkodobým i dlouhodobým přežitím z důvodu zvýšené frekvence výskytu letálních komplikací po transplantaci, zejména s rozvojem střevního GVHD (303).

Asi u jedné třetiny pacientů se vyvine před transplantací infekce způsobená *Clostridium difficile*, což je patogen, který kolonizuje střevo v případě, že jsou komenzálové (zejména Cprotizánětlivá klostridia, AIC) depletovány širokospektrými antibiotiky. Snížení AIC je spojeno s expanzí *Enterococcus spp.*, ke které dochází u pacientů, kteří následně vyvinou GVHD. Monitorování AIC pomocí kvantitativní PCR by mohlo být využito dvěma způsoby. Jednak pro sledování, zda antibiotika nesnižují AIC pod kritický bod a jednak pro rozhodování o dalších časových strategiích týkajících se například nasazení probiotik v rámci repopulace mikrobioty (265).

#### 4. Cíle práce

Cílem této práce je zjistit složení a rozdíl v zastoupení některých střevních mikrorganismů u pacientů před a po transplantaci hematopoetických buněk. Na základě těchto zjištění ověřit případný vliv některých vybraných parametrů (antibiotická profylaxe, přípravný režim, relaps, úmrtí a rozvoj GVHD) na změnu ve složení mikrobioty u transplantovaných pacientů.

## 5. Metodika práce

### 5.1. Charakteristika pacientů

V období od července 2019 do července 2020 bylo získáno celkem 91 vzorků stolice od 52 pacientů, kteří podstoupili alogenní transplantaci hematopoetických buněk v Ústavu hematologie a krevní transfuze v Praze. Medián pro odběr prvního vzorku do dne transplantace byl 7 dnů. Medián pro odběr druhého vzorku ode dne transplantace byl 20 dnů. Pro konečnou analýzu byli vybráni pouze ti pacienti, kteří poskytli oba vzorky (79 vzorků). Všechny údaje pacientů jsou uvedeny v Příloze 1 (str. I)

Skupinu pacientů tvořilo 31 mužů a 21 žen. Věk pacientů se pohyboval v rozmezí od 21 – 67 let (medián 53 let). Mezi nejčastější diagnózy pacientů patřila akutní myeloidní leukémie (22 pacientů), myelodysplastický syndrom (13 pacientů), akutní lymfoblastická a chronická lymfocytární leukémie (8 pacientů). Zpravidla od druhého dne hospitalizace pacienti podstoupili přípravný režim (30 pacientů myeloablativní, 9 nemyeloblativní). Antibiotická profylaxe byla indikována ještě před hospitalizací u 47 pacientů. Dále bylo hodnoceno BMI pacientů, které se na začátku hospitalizace pohybovalo v rozmezí hodnot 19,3 – 42,3 (medián 25) a aplikace PV (parenterální výživy) v průběhu hospitalizace. PV byla aplikována 33 pacientům v délce trvání od 3–30 dnů. Medián pro podání PV byl 6 dnů. U 14 pacientů došlo v období po transplantaci k relapsu onemocnění (u dvou pacientů se jednalo o molekulární relaps). U 3 pacientů došlo k úmrtí (u 2 se jednalo o úmrtí z důvodu relapsu a u 1 pacienta došlo k úmrtí na posttransplantační komplikace). Těžká střevní GVHD se projevila u 2 pacientů. 4 pacienti podstoupili v uvedeném období druhou transplantaci.

Vzorky stolice byly ihned po odebrání uchovány při teplotě -80°C a postupně byly převáženy na suchém ledu do Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. Analýza vzorků proběhla v Laboratoři anaerobní mikrobiologie, kde byly vzorky zpracovány a skladovány při teplotě -20°C. Výzkum proběhl za podpory grantu „Molekulární aspekty raného vývoje obratlovců“ (poskytovatel MŠMT, OPVVV 4605).

Biologický materiál byl získán s písemným souhlasem pacientů, který byl vydán na základě schválení etickou komisí ÚHK v Praze.

### 5.2. Izolace bakteriální DNA pomocí kitu QIAamp® PowerFecal® DNA Kit (Qiagen)

#### Postup:

Bakteriální DNA byla izolována pomocí soupravy QIAamp® PowerFecal® DNA Kit firmy Qiagen. Tato komerčně dostupná souprava je určena pro izolaci DNA ze vzorků stolice. Izolovaná DNA má dostatečně vysokou kvalitu pro použití v metodách jako je PCR, qPCR a sekvenování nové generace (NGS). Postup pro izolaci byl částečně upraven na základě předchozích zkušeností laboratoře.

Nejprve bylo do přiložených zkumavek Bead Tube odváženo množství stolice v hmotnostním rozmezí 0,1 – 0,17 g. Poté bylo přidáno 750 µl PowerBead Solution roztoku a 60 µl roztoku označeného C1. Součástí roztoku C1 je anionické činidlo SDS, které napomáhá štěpení mastných kyselin a lipidů přítomných v buněčných stěnách. Po přidání roztoků byly zkumavky se vzorky zahřívány ve vodní lázni o teplotě 70 °C po dobu 5 minut. Vzorky stolice obsahují komplex polysacharidů, lipidů a ostatních solí, zahříváním vzorků se zvyšuje reakce mezi těmito buněčnými komponentami a lyzačním pufrům a napomáhá lýze buněk. Po zahřátí byly vzorky vloženy do homogenizátoru FastPrep-24 a homogenizovány po dobu 60 vteřin při min. 6,5 x g. Cyklus zahřívání a homogenizace byl dvakrát zopakován. Následně byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty při 13 000 x g. Po centrifugaci byl přenesen supernatant do 2ml zkumavek, do kterých bylo přidáno 250 µl roztoku C2. Po vyjmutí byly vzorky zchlazeny na teplotu 2 – 8 °C po dobu 5 minut. C2 roztok obsahuje činidlo, které usnadňuje vysrážení organických a anorganických součástí buňky, vyjma DNA. Po zchlazení byly vzorky 1 minutu centrifugovány 13 000 x g. 600 µl supernatantu z každého vzorku bylo přeneseno do čistých zkumavek, do kterých bylo přidáno 200 µl roztoku C3 a opět proběhlo zchlazení při teplotě 2 – 8 °C po dobu 5 minut. Následovala centrifugace vzorků při 13 000 x g po dobu 1 minuty. 750 µl supernatantu bylo přeneseno do čistých zkumavek, do kterých bylo přidáno i 1200 µl roztoku C4. C4 roztok je vysoce koncentrovaný solný roztok, který usnadňuje vazbu DNA na oxid křemičitý, který je přítomen na kolonách zkumavek MB Spin Column. Na tyto kolony bylo postupně přenášeno 650 µl supernatantu za současně centrifugace při 13 000 x g po dobu 1 minuty opakovaně, dokud nebyl veškerý supernatant spotřebován. Následně bylo přidáno do zkumavek MB Spin Column 500 µl roztoku C5 a centrifugace po dobu 30 vteřin při 13 000 x g. Roztok C5 je roztok na bázi ethanolu, který odstraňuje sůl a další složky na koloně, a současně tak purifikuje DNA navázanou na koloně. Další centrifugace vyprázdněných zkumavek po dobu 2 minut při 13 000 x g slouží k odstranění zbytků roztoku C5, který by mohl zasahovat do dalších kroků včetně PCR. V následujícím kroku byly kolony opatrně přendány na čisté 2ml zkumavky Collection Tube a převrstveny 100 µl roztoku C6. Poté byly zkumavky centrifugovány při 13 000 x g po dobu 1 minuty. C6 je sterilní eluční pufr, který uvolňuje DNA navázanou na koloně MB Spin Column do čistých zkumavek.

V izolovaných vzorcích DNA byla následně změřena koncentrace na NanoDrop One®, která se pohybovala v rozmezí hodnot 0,5 – 204,3 ng/µl. Vzorky izolované DNA byly zmrazeny a uchovány při teplotě -20 °C.

### 5.3. PCR (Polymerázová řetězová reakce)

V cytoplazmě bakteriálních buněk jsou volně rozptýleny ribosomy, které se skládají ze dvou podjednotek 30S a 50S. Podjednotka 50S obsahuje dvě molekuly RNA: 5S a 23S. 30S podjednotka obsahuje jednu molekulu RNA: 16S ribozomální RNA (16S rRNA). Funkcí této podjednotky je zahájení syntézy proteinů. Podjednotky rRNA (5S, 23S a 16S) jsou mezi bakteriálními druhy vysoce konzervativní, přesto obsahují i variabilní oblasti, které jsou



specifické, a jsou tak cílem pro fylogenetickou identifikaci bakterií. 16S rRNA gen patří k nejsledovanějším a do jeho konzervativních míst jsou často navrhovány cílové primery. Metoda PCR umožňuje amplifikaci 16S rRNA genu. Vysoká teplota na počátku PCR reakce denaturuje dvouvláknovou DNA, následuje nasedání specifických primerů, které jsou komplementární ke konzervativním regionům 16S rRNA genu a za pomoci DNA polymerázy je tvořen nový dvouvláknový fragment DNA. Opakováním tohoto cyklu dochází k exponenciální amplifikaci všech 16S rRNA oblastí genu ve fekální bakteriální komunitě.

#### PCR pro NGS (sekvenování nové generace) analýzu

##### Postup:

Reakční směs pro PCR reakci byla připravena pro vybraných 79 vzorků (Tab. 3). Množství 28  $\mu$ l reakční směsi a 2  $\mu$ l DNA z každého vzorku, bylo rozděleno do 200 $\mu$ l mikrokumavek a vloženo do PCR cycleru T Advanced 96 SG (Biometria) s přednastaveným programem pro amplifikaci oblasti V4 – V5 genu NGS (Tab. 4). Primery a amplifikační program byly zvoleny podle doktorky Fliegerové (304).

**Tab. 3:** Složky PCR reakční směsi pro 1 vzorek

Složky reakční směsi	Objem ( $\mu$ l)
PCR mix	15
„Forward“ primer BactBF	1
„Reverse“ primer BactBR	1
dH <sub>2</sub> O	11
DNA	2

PCR mix: (EliZyme™HS Robust MIX Red, Elisabeth ®Pharmacon), složení:enzym, 2mM dNTP, 6mM MgCl<sub>2</sub>, barvivo, „Forward“ primer BactBF (5'-GGATTAGATACCCTGGTAGT-3'), „Reverse“ primer BactBR (5'-CACGACACGAGCTGACG-3'), dH<sub>2</sub>O (Sigma-Aldrich).

**Tab. 4:** PCR program pro amplifikaci úseku V4 – V5

Počet cyklů	Teplota (C°)	Čas
1	95	5 min
25	95	30 s
	57	30 s
	72	30 s
	72	5 min
1	12	∞

#### Kontrola PCR reakce pomocí ELFO

Pomocí elektroforézy proběhla kontrola přítomnosti amplifikovaného úseku DNA. Po proběhlé PCR reakci bylo odebráno 2,5  $\mu$ l PCR produktu z každého vzorku, který byl nanesen

na připravený 1,5 % agarósový gel obarvený 5 µl ethydium bromidu. Do první jamky bylo napipetováno 2 µl standardu DNA. Celková doba elektroforézy byla 20 minut při 110 V. Výsledné produkty PCR reakce byly vizualizovány pomocí UV světla (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+, Bio-Rad).

#### Purifikace produktu PCR

V této fázi došlo k purifikaci, neboli přečištění PCR produktu. Purifikace PCR produktu, se provádí za účelem odstranit nadbytečné nukleotidy, primery, enzymy a jiné nečistoty, které nebyly použity v rámci PCR reakce.

#### Postup:

PCR produkty určené pro NGS analýzu byly purifikovány sadou Monarch® PCR & DNA Clean up Kit (5 µg). Dle přiloženého protokolu výrobcem (Bio Labs® Inc. New England) byl nejdříve k jednotlivým vzorkům PCR templátu přidán DNA Cleanup Binding Buffer v poměru 1:5. Tedy k 27,5 µl vzorku amplifikovaného úseku DNA bylo přidáno 137,5 µl DNA Cleanup Binding Buffer. Následně byl celý objem přepipetován z mikrozkušavek na přiložené kolony Monarch DNA Cleanup Columns. Zkušavky byly centrifugovány po dobu 1 min/13,000 x g. Odstředěný filtrát byl vylit ze zkušavky. Na kolonu s navázanou DNA bylo aplikováno 200 µl DNA Wash Buffer. Kolona byla opět centrifugována po dobu 1 minuty. Poté byla kolona přenesena na novou 1,5 ml mikrocentrifugační zkušavku a na střed kolony bylo napipetováno 25 µl DNA Elution Buffer. Po jedné minutě inkubace byla zkušavka s kolonou centrifugována po dobu 1 minuty. V této fázi došlo k eluci DNA z kolony do mikrocentrifugační zkušavky. Posledním krokem purifikace bylo změření koncentrací purifikované DNA na přístroji NanoDrop One®.

### 5.4. NGS analýza mikrobiální diversity

Pro podrobnou analýzu mikrobiálního osídlení všech studovaných vzorků byla využita metoda sekvenování nové generace (NGS). Jedná se o technologii, která umožňuje masivní paralelní sekvenování až tisíce molekul DNA současně za krátký časový úsek. Laboratoř anaerobní mikrobiologie, ve které byla analýza provedena, využívá k sekvenování polovodičovou technologii Ion Torrent. Sekvenování na platformě Ion Torrent je založeno na přirozeném jevu syntézy DNA, kdy při tvorbě fosfodiesterové vazby a začleňování nukleotidů do nově vznikajícího řetězce DNA dochází k uvolnění H<sup>+</sup> vodíkového iontu. Uvolnění H<sup>+</sup> vodíkového iontu (protonu) vyvolá změnu (pokles) pH okolního roztoku. Změna pH, která je úměrná počtu zařazených nukleotidů, vyvolává změnu napětí, která je detekována iontovým čipem. Sekvenci DNA lze odvodit na základě toho, že je známo, který ze čtyř nukleotidů byl přítomen ve vzorku v době začleňování a způsobil změnu pH, a tedy i napětí.

Vlastnímu sekvenování předchází příprava knihovny (PCR produktu), následuje emulzní PCR (emPCR). Emulzní PCR v technologii Ion Torrent vychází z principu, kdy jsou k molekulám vytvořené knihovny přidány templátové pozitivní částice (ISPs), které obsahují

sekvence oligonukleotidů komplementární k adaptorum, které jsou připojeny k molekulám PCR produktů v rámci přípravy knihovny. Následuje amplifikace PCR produktů v olejové emulzi. Po procesu amplifikace proběhne proces „enrichment“ neboli obohacení, kdy jsou pomocí streptavidinových magnetických kuliček odstraněny ty ISPs částice, na kterých nedošlo k navázání molekul PCR knihovny, a tedy ani k amplifikaci.

V průběhu sekvenační reakce je amplifikovaný templát doplněn o sekvenační primery a DNA polymerázu. Sekvenační reakce probíhá na povrchu speciálního polovodičového čipu, který je tvořen mikroskopickými komůrkami, do kterých se vejde vždy jen jedna kulička s amplifikovanou DNA. Na dně komůrky se nachází vrstva citlivá na změnu pH. Tato vrstva je tvořena oxidy tantalu a odpovídá na změnu pH roztoku změnou vlastního elektrického potenciálu. Pod pH citlivou vrstvou se nachází vrstva polovodičových tranzistorů, které zesilují změnu potenciálu a převedou ji k dalšímu elektronickému zpracování. Čip je naplňován postupně vždy jen jedním druhem nukleotidu, který se buď zařadí do řetězce DNA a způsobí změnu pH, nebo je odmyt pufrém, který zároveň v případě vychýlení opět ustálí pH na výchozí hodnotě (305).

## Příprava knihovny

### Postup:

Základním krokem pro NGS je příprava knihovny PCR produktu (amplifikovaného úseku DNA vymezeného dvojicí primerů). Jedná se o úsek dlouhý přibližně 300 bp. Příprava knihovny sestává ze čtyř kroků.

V prvním kroku dochází k úpravě konců PCR produktu a vytvoření fragmentů s tupým zakončením.

Ve druhém kroku jsou k takto upraveným koncům připojeny sekvenační adaptory, krátké molekuly DNA, které umožňují navázání PCR produktů knihovny ke komplementárním strukturám, které jsou umístěny na kuličkách (ISPs – templát pozitivní částice). Ke každému vzorku knihovny je připojen tzv. barcode, specifická sekvence sloužící k identifikaci každého vzorku při závěrečné analýze.

Ve třetím kroku probíhá purifikace produktů knihovny pomocí Ampure Beads a následuje amplifikace pomocí PCR těch úseků DNA, které obsahují připojené adaptory a barcodes. Posledním krokem po proběhlé amplifikaci je opět purifikace pomocí Ampure Beads.

Příprava knihovny 79 vzorků proběhala dle protokolu s určitými modifikacemi na základě výzkumných zkušeností laboratoře.

- Úprava konců „End repair“

### Postup:

Na základě zjištěných koncentrací PCR produktu po purifikaci, které se pohybovaly mezi hodnotami 20,5 – 96,8 ng/μl, bylo upraveno oproti původnímu protokolu množství DNA

templátu z 5 µl na 7 µl a množství dH<sub>2</sub>O z 20,5 µl na 18,5 µl. Do jamek PCR desky bylo napipetováno 23 µl reakční směsi a 7 µl amplifikovaného DNA templátu. Takto připravená PCR deska byla inkubována v termocykleru podle následujícího programu:

25 °C – 20 min, 70 °C – 10 min.

**Tab. 5:** Úprava konců DNA templátu. Složky reakční směsi pro 1 vzorek

Složky reakční směsi	Objem (µl)
ER buffer	3
ER enzym	1,5
dH <sub>2</sub> O	18,5
Celkem	23

- Připojení adaptorů a barcodů k templátu

Postup:

Reakční směs pro všechny vzorky byla připravena dle tab. 6. Do každé jamky PCR desky z předchozího kroku bylo přidáno 19 µl této reakční směsi a 1 µl specifických barcodů. Následovala inkubace v termocykleru s programem: 25 °C – 5 min, 65 °C – 5 minut.

**Tab. 6:** Připojení adaptorů. Složky reakční směsi pro 1 vzorek

Složky reakční směsi	Objem (µl)
T4 ligase buffer	5
P1 adaptor	0,5
DNA polymerase	0,5
T4 ligase	2,5
dH <sub>2</sub> O	10,5
Celkem	19

- Purifikace pomocí Ampure Beads (Beckman Coulter)

K výslednému objemu 50 µl vzorku v PCR desce bylo přidáno 1,2 objemu Ampure Beads (60 µl). Obsah byl několikrát promíchán. PCR deska byla inkubována při pokojové teplotě 2 – 5 min (navázání DNA na kuličky). Následně byla PCR deska umístěna na magnetický stojánek a inkubována dokud nebyl obsah jamky čirý (cca 2 min). Po odstranění čirého supernatantu byla PCR deska vrácena na magnetický stojánek a následovalo opláchnutí peletu (kuličky s navázanou DNA) 180 µl 70% ethanolu, po minutě byl ethanol odstraněn a postup byl zopakován. Po druhém oplachu byl odstraněn veškerý zbylý ethanol bez narušení vrstvy peletu a vysušen při pokojové teplotě (2 – 3 min). PCR deska byla vyjmuta z magnetického stojánku a do každé jamky bylo přidáno 50 µl 10mM Tris-HCl). Obsah jamky byl promíchán opětovným nasátím špičkou pipety. Následovala inkubace 2

minuty (eluze DNA z kuliček) a poté byla PCR deska vrácena zpátky na magnetický stojánek (separace kuliček od DNA). Inkubace probíhala, dokud nebyl roztok v jamce čirý. Čirý supernatant (obsahující DNA) byl přenesen do jamek nové PCR desky.

- Amplifikace knihovny

V této části dochází k amplifikaci pouze těch úseků DNA, na kterých jsou navázány adaptory a barcodey. Amplifikace se provádí za účelem zesílit výsledný signál pro sekvenaci.

**Postup:**

Do nové PCR desky bylo napipetováno 27  $\mu$ l reakční směsi pro amplifikaci. (viz. Tab. 7). K reakční směsi bylo přidáno 23  $\mu$ l přečištěných vzorků DNA z předchozího kroku. Následovala inkubace PCR desky v termocykleru TAdvanced 96SG (Biometria) s následujícím programem: 98 °C – 30 s, 8 cyklů (98 °C – 10 s, 58 °C – 30 s, 72 °C – 30 s).

Po proběhnutí PCR následovalo znovu přečištění pomocí magnetických kuliček Ampure Beads.

**Tab. 7:** Reakční směs pro amplifikaci 1 vzorku

Složky reakční směsi	Objem ( $\mu$ l)
Primers	2
2x PCR MM	25
Total	27

- Ředění knihovny

Před provedením qPCR bylo nutné vzorky DNA naředit v poměru 1:20, 1:500 a 1:5000. qPCR se provádí za účelem zjistit koncentraci amplifikované DNA.

**Postup:**

Pro ředění byly připraveny a označeny tři PCR desky. První deska byla použita pro ředění 1:20. Do jamek této desky bylo nanášeno 95  $\mu$ l 10mM Tris + 5  $\mu$ l přečištěné DNA. Druhá deska byla určena pro ředění 1:500. Do jednotlivých jamek této desky bylo napipetováno 96  $\mu$ l 10mM Tris a bylo přidáno 4  $\mu$ l zředěných DNA vzorků z desky č. 1. V poslední třetí PCR desce bylo do jamek desky napipetováno 90  $\mu$ l 10mM TRis a 10  $\mu$ l naředěných vzorků z desky číslo 2. Takto bylo dosaženo výsledné koncentrace 1:5000.

**Kvantifikace knihovny qPCR**

Pro kvantifikaci DNA ve vzorcích byla použita souprava KAPA Library Quantification Kit pro Ion Torrent™ Platforms.

### Postup:

Do jamek PCR desky bylo postupně napipetováno multikanálovou pipetou 6,2 µl PCR směsi připravené dle tab. 8. K reakční směsi určené pro vzorky byly přidány 4 µl DNA ředěné v poměru 1:5000. Do ostatních šesti jamek byly přidány 4 µl DNA standardu 1 – 6 o známé molekulové hmotnosti viz tab. 9. Do dvou jamek byly napipetovány k reakční směsi 4 µl ultra čisté destilované vody. Takto připravená PCR deska byla vložena do qPCR cykleru s nastaveným programem pro qPCR (viz tab. 10). Pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel byl z výsledných hodnot určen poměr ředění.

**Tab. 8:** Složky reakční qPCR směsi pro jeden vzorek. DNA poměr ředění (1:5000)

Složky reakční směsi	Objem (µl)
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2x)	5
PrimerPremix (10x)	1
ROX HighorLow (50x)	0,2
DNA	4

**Tab. 9:** Koncentrace standardů KAPA

	Koncentrace (pM)
STD1	83
STD2	8,3
STD3	0,83
STD4	0,083
STD5	0,0083
STD6	0,00083

**Tab. 10:** Reakční podmínky pro qPCR reakci

Krok	Počet cyklů	Teplota	Čas
1.	1	95°C	5min
2.	35	95°C	30s
3.		60°C	45s
4.	65-95°		

### Analýza velikosti DNA fragmentu

Kromě měření koncentrace DNA metodou qPCR byla provedena i analýza velikosti fragmentu DNA pomocí Agilent 2100 Bioanalyzeru. K měření byl použit čip s označením 10 High Sensitivity DNA Chips pro měření 11 DNA vzorků o délce 50 – 7000 bp. Ke kontrole bylo vybráno náhodně 11 vzorků.

## Postup:

Na začátku analýzy byl připraven mix gelu a barviva a byla provedena kontrola přiloženého High Sensitivity DNA čipu. Reagencie pro analýzu byla před použitím ponechána 30 min při pokojové teplotě. High sensitivity DNA barvivo bylo po celou dobu analýzy chráněno před světlem.

## Příprava Gel-Dye mixu

Nejdříve byl připraven roztok Gel-Dye mix. Pro jeho přípravu bylo použito 15  $\mu$ l High Sensitivity DNA barviva, které bylo aplikováno do High Sensitivity DNA gelu. Směs byla vortexována a přenesena na přiloženou kolonku s filtrem, následně byla centrifugována po dobu 15 minut/2400 otáček. Přefiltrovaný gel byl připraven k použití.

High Sensitivity DNA chip byl vložen do pipetovací stanice Agilent Bioanalyzátoru. Píst stříkačky byl nastaven na 1 ml. Do jamky čipu označené písmenem G bylo napipetováno 9  $\mu$ l připraveného mixu gel – barvivo. Čipová stanice byla uzavřena, píst byl stlačen směrem dolů a sevaknut svorkou. Po 1 minutě byla svorka uvolněna a píst byl po 5 vteřinách manuálně vrácen na hodnotu 1 ml. Mix gelu a barviva byl nanesen do dalších dvou jamek označených písmenem G. Postupně bylo do označených jamek čipu napipetováno 5  $\mu$ l High Sensitivity DNA markeru a do jamky označené symbolem žebřík byl napipetován 1  $\mu$ l High sensitivity DNA ladderu. Do 11 jamek určených pro vzorky byl nanesen 1  $\mu$ l náhodně vybraných vzorků. Takto připravený čip byl zvortexován po dobu 1 minuty pomocí IKA vortex mikrocetrifugy a následně vložen do Agilent 2100 Bioanalyzátoru ke konečné analýze.

Na základě výsledku měření koncentrace PCR produktů pomocí qPCR analýzy a délky fragmentu pomocí Agilent Bioanalyzátoru byly vzorky naředěny dle vypočítaných poměrů ředění, při kterém bylo dosaženo optimální koncentrace pro sekvenaci NGS 26 pM. Z každého vzorku byl přenesen 1  $\mu$ l do 0,5 ml Eppendorf zkumavky. Tímto krokem byla vytvořena konečná knihovna, která byla použita pro následnou emulzní PCR a sekvenování.

## Příprava sekvenačního templátu – emulzní PCR

### Postup:

Pro přípravu sekvenačního templátu byla použita komerční sada Ion PGM™ Hi-Q™ View Kit a systém Ion OneTouch™ 2 (Thermo Fisher Scientific). Systém Ion OneTouch™ 2 se skládá ze dvou modulů. OneTouch™ 2 Instrument a OneTouch™ ES (enrichment systém). Technologie OneTouch™ 2 Instrument umožňuje automatické dodávání templátově pozitivních částic Ion Sphere™, na které se navazují templáty knihoven. Mezi základní technologie přístroje OneTouch™ 2 Instrument patří: reakční filtr, který vytváří milióny mikroreaktorů (miniurních bublinek), které jsou tvořeny emulzí (olej-voda) a ve kterých dochází ke klonální amplifikaci fragmentů DNA. Dále je přítomen integrovaný tepelný cyklovač (termocykler) a jednorázová amplifikační deska, které umožňují tepelné cyklování mikroreaktorů. Součástí je i integrovaná centrifuga, která obnovuje templátově pozitivní

částice Ion Sphere™. Systém OneTouch™ ES (enrichment) využívá technologie magnetických kuliček k izolaci templátově pozitivních částic IonSphere™.

Obr. 1: Ion OneTouch™ 2 (Thermo Fisher Scientific)



Samotná emulzní PCR byla zahájena předvolbou programu PGM: Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit 400. Následovalo umístění dvou Recovery Tubes (zkumavek) do integrované centrifugy (Obr. 2) a přidání 150 µl Ion OneTouch™ Breaking Solution roztoku do každé z nich. Mezi Recovery Tubes byl vložen Recovery Router. Po proběhnutí emulzní PCR se částice ISPs s navázanými templáty knihoven nachází v obou Recovery Tubes.

Obr. 2: Umístění Recovery Tubes a Recovery Router do centrifugy



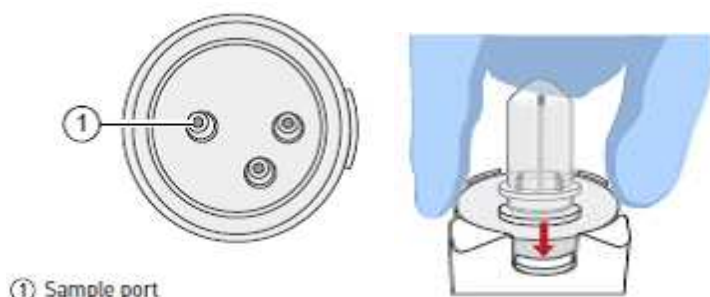
Do části přístroje, kterou tvoří termocykler, byla vložena nová amplifikační deska. Dále byl instalován jednorázový injektor v části, do které se upevňuje reakční filtr a dvě nové reagenční zkumavky v přední části termocykleru. Jedna byla naplněna do poloviny Ion OneTouch™ olejem a druhá, byla do jedné čtvrtiny zaplněna Ion OneTouch™ Recovery roztokem. Následně byl připraven amplifikační roztok, který obsahoval vzorek naředěné knihovny z předchozího kroku (viz. Tab. 11).



**Tab. 11:** Reakční složky pro přípravu amplifikačního roztoku

Reakční složky	Objem (μl)
dH <sub>2</sub> O	25
Ion PGM™ Hi-Q™ View Enzyme mix	50
Rředěná knihovna (26pM)	25
Ion PGM™ Hi-Q™ ViewISPs	100

Obr. 3: Reakční filtr



1000 μl amplifikačního roztoku bylo napipetováno do otvoru reakčního filtru označeného jako sample port (Obr. 3). Do stejného portu bylo napipetováno 850 μl reakčního oleje (25 ml), následně byla vyměněna špička pipety a aplikováno dalších 850 μl reakčního oleje. Naplněný reakční filtr byl několikrát převrácen a nainstalován do horní části cykleru (Obr. 3). Program pro emulzní PCR byl spuštěn v odpoledních hodinách. Doporučená délka trvání je < 16 hod.

Druhý den v ranních hodinách byly zahájeny další kroky v rámci přípravy sekvenačního templátu: Obnovení ISPs částic a jejich „obohacení“ (enrichment). Z obou Recovery Tubes umístěných uvnitř centrifugy bylo odebráno 100 μl Recovery solution a přidáno bylo 500 μl Wash Solution – promývacího roztoku. Obsah byl opětovným nasáváním špičkou pipety promíchán s ISPs částicemi a následně byl přenesen do jedné 1,5ml zkumavky. Zkumavka byla centrifugována po dobu 2,5 min (15,500 x g). Po centrifugaci byl odebrán promývací roztok na opačné straně od peletu, kromě 100 μl roztoku, který byl ve zkumavce ponechán.

#### Obohacení templát pozitivních částic ISPs pomocí OneTouch™ ES

V této fázi dochází k selekci a odstranění částic (ISPs), na nichž nedošlo k navázání fragmentu knihovny, a tedy ani k amplifikaci. V průběhu sekvenační reakce se přichytí sekvenační primer pouze na částice s amplikony.

Nejdříve byl připraven 8-jamkový strip (Obr. 4). Do první jamky byla přenesena promíchaná suspenze ISPs částic z předchozího kroku. Následně byl připraven Melt-Off Solution smícháním složek, které jsou uvedeny v tab. 12:

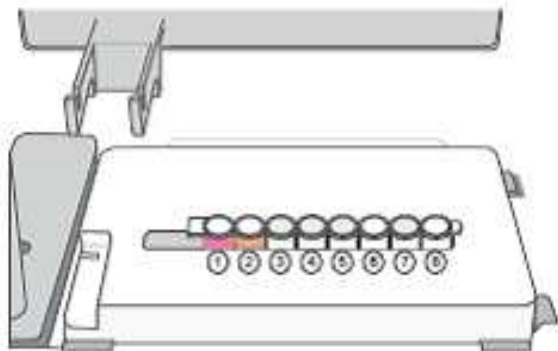
**Tab. 12:** Reakční složky pro přípravu Melt-Off Solution

Reakční složky	Objem (μl)
Tween™ solution	280
1M NaOH	40
Celkem	320

Dále byly připraveny Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads magnetické kuličky. Zkumavka s kuličkami byla nejprve důkladně promíchána po dobu 30 vteřin. 13 μl kuliček Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads bylo napipetováno do nové 1,5ml zkumavky, která byla umístěna na magnet po dobu 2 minut. Následně byl odstraněn supernatant bez porušení peletu kuliček. Ke kuličkám bylo přidáno 130 μl promývacího roztoku. Zkumavka byla vyjmuta z magnetu a zvortexována. 8-jamkový strip byl připraven dle tab. 13:

**Tab. 13:** Schéma pro naplnění jamek stripu 1-8

Pořadí jamek stripu 1-8	Reagencie
1. ISPs	100 μl ISPs částic
2. Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads	130 μl Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads + Washsolution
3. Ion OneTouch™ Wash Solution	300 μl Ion OneTouch™ Wash Solution
4. Ion OneTouch™ Wash Solution	300 μl Ion OneTouch™ Wash Solution
5. Ion OneTouch™ Wash Solution	300 μl Ion OneTouch™ Wash Solution
6.	///
7. Melt-Off Solution	300 μl Melt-Off Solution
8.	///

**Obr. 4:** Strip 1-8 jamek OneTouch™

Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1 Beads byla nanášeny do stripu jako poslední. Osmá jamka byla určena k eluci roztoku z kuliček.

Po naplnění stripu byla nainstalována nová zkumavka o objemu 0,2 ml pro konečný

odběr vzorku a nová špička do držáku ramene Ion OneTouch™ ES. Do připravené 0,2ml PCR zkumavky byl přidán neutralizační roztok (Obr. 5).

Obr. 5: Příprava držáku ramene Ion OneTouch™ ES



Délka celého cyklu trvala přibližně 35 minut. Bezprostředně po běhu byla uzavřena a vyjmuta 0,2 ml PCR zkumavka, která obsahovala obohacené ISPs částice.

#### Sekvenování pomocí Ion PGM™ HI-Q™

Obr. 6: Ion PGM™ HI-Q™



#### Postup:

V rámci inicializace Ion PGM™ sekvenátoru proběhlo nejdříve jeho čištění vodou 18 MΩ. Připraveny byly jednotlivé promývací roztoky W1, W2 a W3. Následovala předvolba programu pro sekvenaci, kde byl vybrán typ použitého kitu IonPGM™: Hi-Q™ View Sequencing Kit. Po zvolení systém sám zkontroloval tlak plynu v připojené dusíkové láhvi. Dále byly upevněny promývací láhve s roztoky do správných pozic sekvenátoru. Sekvenátor automaticky začal s úpravou pH roztoku v láhvi Wash 2. Tento proces trval přibližně 30 minut. Následně byly připraveny a označeny čtyři reakční nádoby pro nukleotidy dGTP, dCTP, dATP a dTTP. Do každé reakční láhve bylo přidáno 20 µl zásobního roztoku nukleotidů. Po kalibraci promývacích roztoků byly upevněny láhve s nukleotidy, a tím byla dokončena inicializace

sekvenátoru. Přístroj naplnil každou reakční nádobu s nukleotidy 40 ml roztoku W2. Na konci inicializace přístroj změřil pH reagensí.

Následovala příprava polovodičového čipu Ion 318™ Chip Kit v2 BC. Nejdříve byly promíchány kontrolní částice Control Ion Sphere™, ze kterých bylo odebráno 5 µl a přidáno přímo do 0,2ml PCR zkumavky k obohaceným ISPs částicím.

Obsah zkumavky byl znovu promíchán a 2 min centrifugován (15 500 x g). Supernatant byl odstraněn vyjma 15 µl, které byly ponechány ve zkumavce. Do zkumavky bylo přidáno 12 µl sekvenačního primeru. Celkový objem zkumavky (27 µl) byl důkladně promíchán, tak aby došlo k disrupci peletu a vložen do termocykleru na 95 °C/2 minuty a 37 °C/2 minuty. Dále byla provedena kontrola čipu. Po ukončení kontroly byl naskenován čárový kód nového čipu. Po ukončení programu pro připojení sekvenačního primeru byly přidány k ISPs částicím 3 µl IonPGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerasy do celkového objemu 30 µl. Obsah zkumavky byl opětovným nasáváním pipetou promíchán a zkumavka byla inkubována při pokojové teplotě 5 minut.

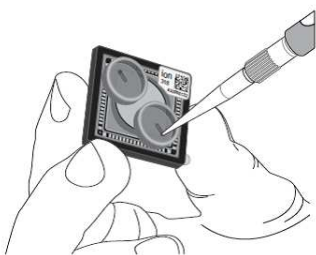
Na čip bylo postupně aplikováno 30 µl templátu (ISPs částice spolu s Control Ion Sphere™ Particles a Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Polymerasa) (Obr. 7).

Obr. 7: Aplikace ISPs částic na Ion chip™



Pomocí Ion chip™ Minicentrifugy byla několikrát opakována centrifugace čipu a následně byla odsáta nadbytečná tekutina z jeho plnicího portu (Obr. 8).

Obr. 8: Odsátí tekutiny z portu Ion čipu (Chip™)



Plnicí port, do kterého byl nanesen templát pro sekvenaci, byl opětovným nasáváním špičkou pipety několikrát promíchán a čip byl vložen do svorky portu sekvenátoru. Poté proběhla jeho kalibrace, která trvala asi 1 minutu a byl zahájen běh sekvenátoru, který trval 4 hodiny.

## 5.5. Analýza získaných dat

Získané sekvence byly staženy ve formě FASTQ a analyzovány v programu QIIME2 (306). Pro analýzu jednotlivých dat, výsledků sekvenování, byl použit software program QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Jedná se o bioinformatický software, který umožňuje zpracování získaných dat ze sekvenátoru PGM Ion Torrent. Analýza sekvencí a statistické vyhodnocení bylo provedeno PostDoc. Chahrazed Mekadim PhD. na ÚŽFG AV ČR.

V jednotlivých krocích proběhl:

1. Demultiplexing dat – jde o proces, při kterém jsou NGS sekvence přiřazeny k odpovídajícímu vzorku na základě sekvencí jejich barcodů.
2. Denoising – pomocí DADA 2 (open source software) dochází ke kontrole kvality demultiplexovaných sekvencí. Ze sekvencí jsou odstraněny nebiologické části např. primery, chiméry a dochází k ořezávání jejich délky.
3. Přiřazení taxonomických shluků pomocí VSEARCH (open source – nástroj pro zpracování a přípravu metagenomiky, genomiky a populačních genomických sekvenačních dat) s použitím SILVA databáze (komplexní on-line zdroj pro kontrolu kvality a zarovnání dat sekvence ribozomální RNA)
4. Analýza diverzity – určení alfa a beta diverzity (výsledky PcoA analýzy, Shannonův index diversity)

## 6. Výsledky

### 6.1. Stanovení bakteriální diversity metodou NGS

Metodou NGS bylo zpracováno všech 79 vzorků stolice. Z původních 91 vzorků byly vyčleněny vzorky těch pacientů, od kterých se nepodařilo získat oba vzorky. Na obr. 9 jsou zobrazeny parametry NGS reakce. Sekvenační čip byl při analýze pokryt z 60 %. Těchto 60 % představovalo 3 771 197 DNA sekvencí. Po kontrole a vyřazení fragmentů nízké kvality, polyklonálních fragmentů a dimerů adaptorů byl konečný počet sekvencí 2 654 421. Výsledky NGS analýzy byly ve formě FASTQ formátu zpracovány pomocí software QIIME2. Následně byla z těchto dat určena taxonomie jednotlivých bakteriálních zástupců, dále byla popsána změna diversity bakteriálních společenstev a provedeno její vyhodnocení pomocí krabicových grafů. Pomocí analýzy PcoA byla porovnána míra podobnosti jednotlivých vzorků.

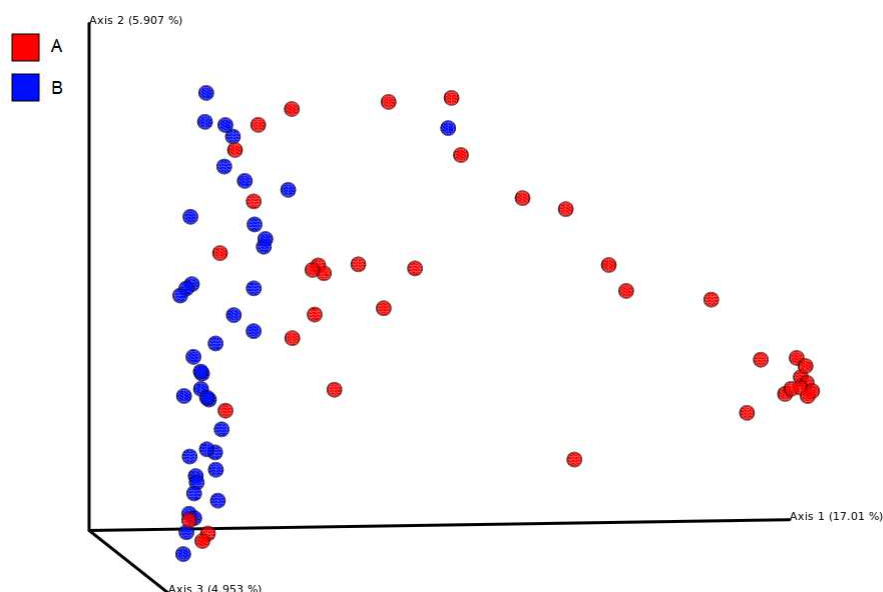
**Obr. 9:** Parametry reakce NGS



### 6.2. Hodnocení změn mikrobiální diversity vlivem transplantace

Analýza hlavních koordinát (PcoA) umožňuje vizualizaci dat souboru pomocí trojrozměrného prostoru. Graf poukazuje na určitou homogenitu/heterogenitu dat, na míru jejich podobnosti. Čím více jsou si vzorky podobné, tím více se k sobě v grafu shlukují. Naopak čím více se vzorky liší, tím více jsou v grafu lokalizovány náhodně.

**Obr. 10:** Vzorky střevní mikrobioty u pacientů před B (before) a po A (after) alo-HSCT zhodnoceny metodou PCoA

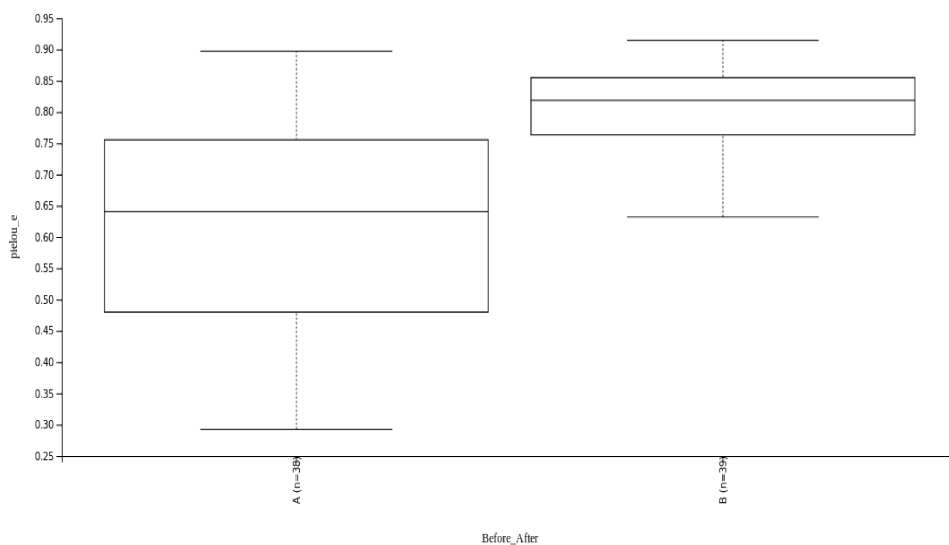


Porovnány byly vzorky mikrobiálního osídlení u pacientů před a po alo-HSCT. Na obr. 10 jsou vzorky pacientů před transplantací znázorněny modře a vzorky pacientů po transplantaci jsou znázorněny červeně. Skupina pacientů před transplantací (B) má relativně homogenní mikrobiální osídlení, vzorky mají tendenci se shlukovat. Zatímco u skupiny pacientů po transplantaci (A) je míra podobnosti mezi jednotlivými vzorky pacientů nižší, vzorky jsou více rozptýleny v pravé části grafu, což ukazuje na jejich vyšší variabilitu. V tomto případě ovšem výsledek analýzy neodráží míru diversity mikrobioty před a po transplantaci, ale poukazuje na fakt, že zatímco mikrobiota zdravých jedinců je i přes mírné individuální rozdíly velmi podobná, u jedinců po transplantaci prochází mikrobiota výraznou proměnou, která je velmi různorodá. Zatímco u některých pacientů je mikrobiota vlivem léčebného režimu relativně málo zasažena a zachovává si podobný charakter jako před transplantací, u většiny pacientů dochází k významným změnám, v jejichž důsledku se mikrobiota po transplantaci výrazně liší od původního stavu.

Pro detailnější zkoumání změn diversity mikrobioty vlivem léčebného režimu byly využity 3 statistické testy pro popis biodiversity společenstev a byly vyhodnoceny následující parametry diversity: rovnoměrnost (pomocí Pielou evenness indexu), vyrovnanost (pomocí Shannon-Wiener indexu) a fylogenetická diversita (pomocí Faith indexu). Výsledky těchto testů jsou uvedeny dále ve formě krabicových grafů.

První graf udává rovnoměrnost (evenness) druhů mikrobioty pomocí Pielou evenness indexu. Tento index vyjadřuje aktuální diversitu společenstva vůči jeho maximální možné diversitě. Nejvyšší možná diversita odpovídá hodnotě indexu 1, naopak nízká hodnota indexu svědčí o monodominanci pouze jednoho bakteriálního druhu.

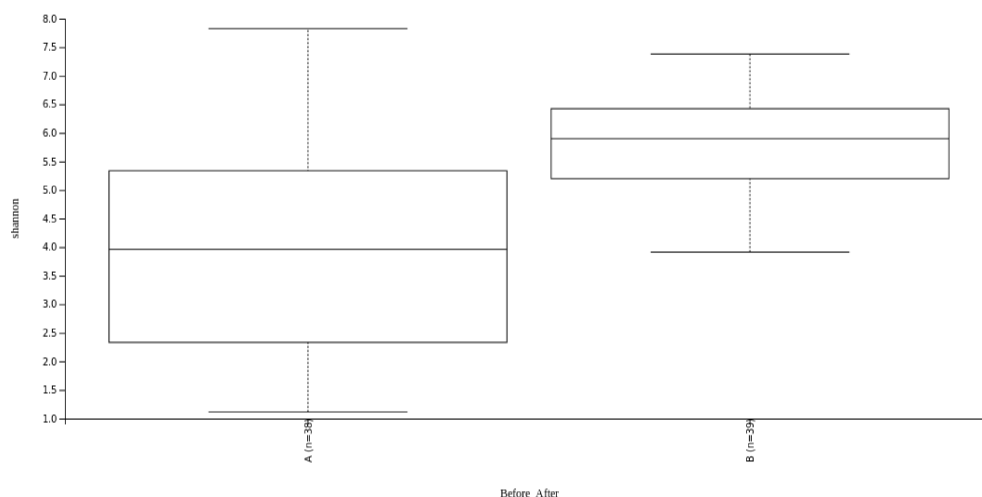
**Obr. 11:** Krabicový graf rovnoměrnosti mikrobiální diversity (Pielou evenness index). Skupina A (after), skupina B (before) alo-HSCT



Skupina B (pacienti před transplantací) vykazují vysokou diversitu mikrobioty (průměrná hodnota indexu 0,82) a výsledky většiny pacientů jsou si velmi podobné, 75 % osob v souboru dosahuje průměrné hodnoty indexu 0,77 – 0,85. Skupina A (pacienti po transplantaci) mají oproti skupině B diversitu sniženou, průměrná hodnota indexu je pouze 0,64. Zároveň 75 % souboru A má průměrnou hodnotu diversity 0,48 – 0,76, což poukazuje na mnohem větší variabilitu výsledků oproti skupině B.

Druhý krabicový graf popisuje vyrovnanost mikrobiální diversity pomocí Shannon-Wiener indexu. Tento index udává počet jedinců konkrétního bakteriálního druhu vůči celkovému počtu jedinců v souboru. Čím vyšší je číslo indexu, tím je vyšší i diversita.

**Obr. 12:** Krabicový graf vyrovnanosti mikrobiální diversity (Shannon-Wiener index). Skupina A (after), skupina B (before) alo-HSCT

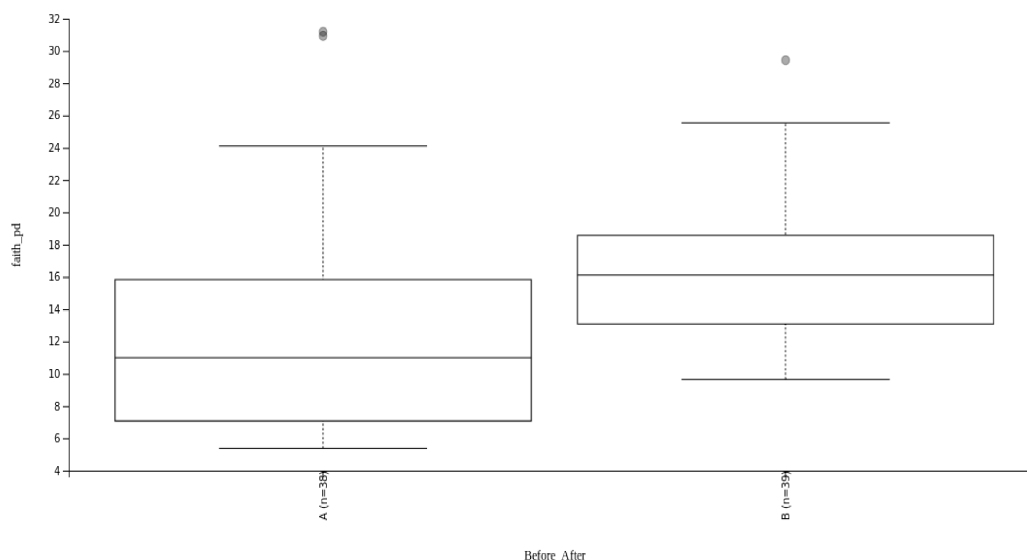




Ve skupině pacientů před transplantací (B) byla zjištěna průměrná hodnota Shannon-Wiener indexu 5,9, přičemž 75 % pacientů v souboru dosahovalo průměrných hodnot indexu 5,2 – 6,5. Oproti tomu index vyrovnanosti u pacientů po transplantaci (A) měl průměrnou hodnotu pouze 4,0 a rozsah průměrných hodnot u 75 % pacientů byl 2,4 – 5,4. I v tomto případě tudíž výsledky svědčí pro sníženou diversitu mikrobioty u pacientů po transplantaci.

Třetí krabicový graf popisuje fylogenetickou diversitu (PD) pomocí Faith indexu. PD udává součet délky všech větví mikrobiálního fylogenetického stromu. Čím vyšší je hodnota PD, tím vyšší je i diversita mikrobiálního společenstva.

**Obr. 13:** Krabicový graf fylogenetické diversity PD (Faith index). Skupina A (after), skupina B (before) alo-HSCT



U skupiny pacientů před transplantací (B) je hodnota PD 16,1, u pacientů po transplantaci pouze 11,0. Stejně jako v předchozích případech i tyto výsledky ukazují zároveň na vyšší heterogenitu dat u pacientů po transplantaci – zatímco u pacientů před transplantací (B) dosahovala hodnota PD u 75 % souboru 13,2 – 18,7, u pacientů po transplantaci (A) se tato hodnota pohybovala v rozmezí 7,0 – 16,0. Skupina A zároveň vykazovala více odlehlé hodnoty oproti skupině B (viz graficky znázorněné body nad krabicemi). Z výsledků grafu je patrné, že u jednotlivých bakteriálních kmenů dochází vlivem transplantace ke zkrácení fylogenetického stromu, a kmen se tak stává méně různorodým.

Detailní hodnocení diversity mikrobioty pacientů před a po transplantaci ve všech dílčích testech prokázalo snížení diversity ve skupině pacientů po transplantaci. Zároveň bylo z výsledků všech testů patrné, že vliv transplantace na diversitu mikrobioty je velmi různorodý vzhledem k vyšší variabilitě dat ve skupině A, což prokázal i výsledek PCoA. Uvedené výsledky poukazují na fakt, že transplantační léčebný režim způsobuje ve většině

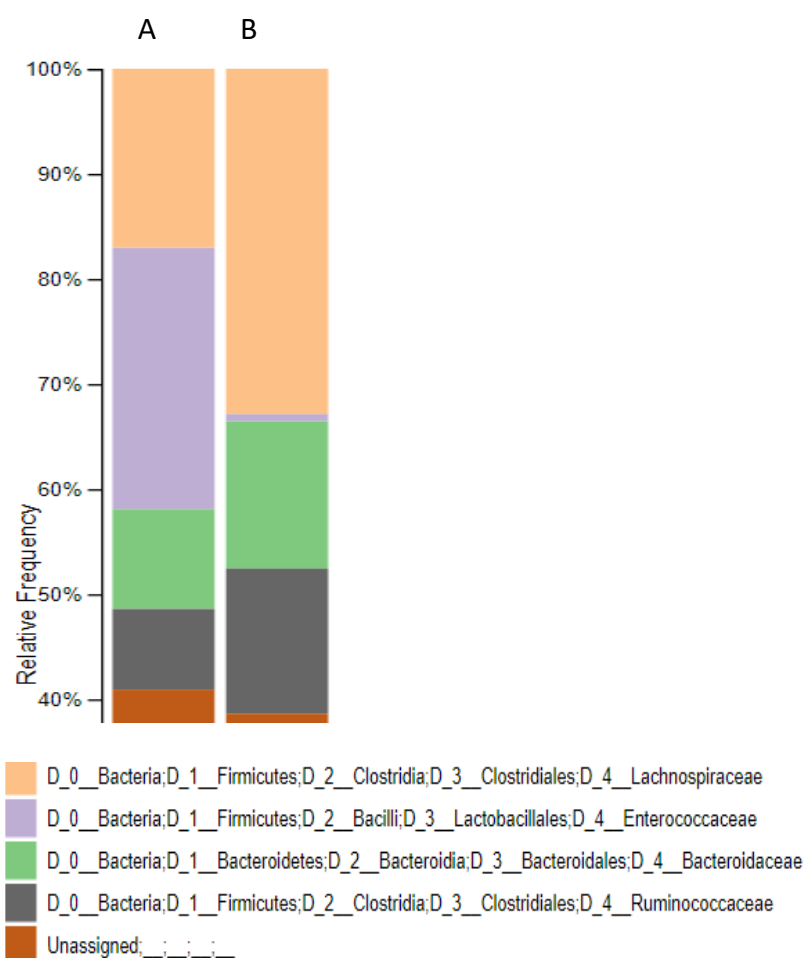
případů výraznou proměnu mikrobioty pacientů. Z tohoto důvodu byl v rámci experimentu dále sledován i vliv konkrétních parametrů léčebného režimu, aby bylo možné posoudit, jak jednotlivé léčebné kroky (např. antibiotická profylaxe, kondicionální režimy, nutrice) ovlivňují diversitu mikrobioty.

### 6.3. Určení taxonomie bakteriálních zástupců

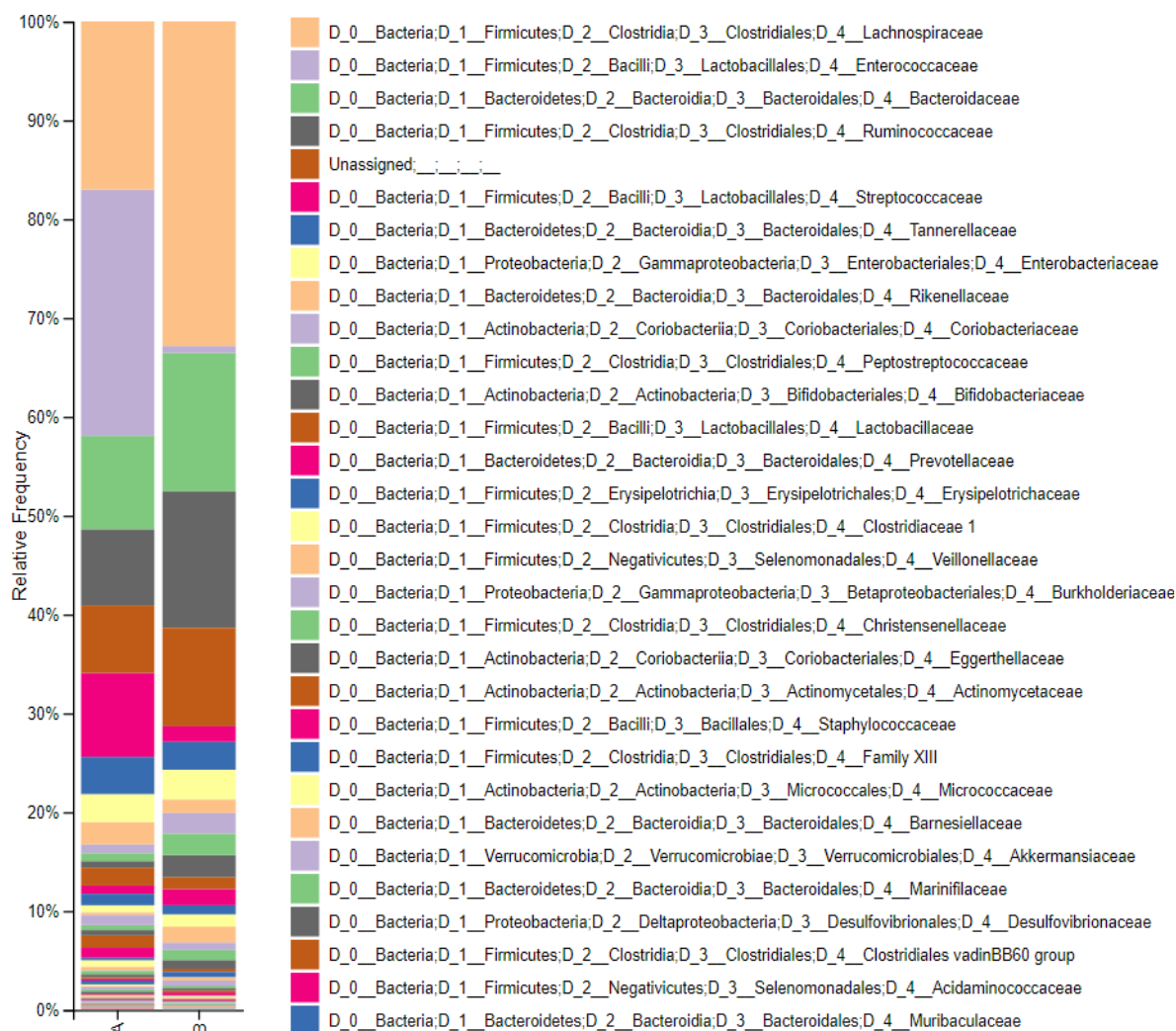
#### 6.3.1. Obecné změny mikrobioty v důsledku transplantace

U pacientů obou skupin byly graficky znázorněny jednotlivé taxonomické jednotky a jejich frekvence výskytu v mikrobiotě. Členění bylo hodnoceno na úrovni tříd, řádů a čeledí. Pomocí Microsoft Excel bylo zjištěno procentuální zastoupení jednotlivých mikroorganismů.

**Obr. 14:** Grafické znázornění taxonomických jednotek mikroorganismů střevní mikrobioty u pacientů s alo-HSCT. Sloupec A (po transplantaci), sloupec B (před transplantací).



**Obr. 15:** Grafické znázornění taxonomických jednotek mikroorganismů v mikrobiotě se zkrácenou legendou, sloupec A (po transplantaci), sloupec B (před transplantací).



Ukázalo se, že u jedinců před transplantací nejvíce dominuje kmen Firmicutes, který tvoří 58,54 % celkové mikrobioty. V rámci tohoto kmene je dominantní třída Clostridia (52,13 % celkové mikrobioty), konkrétně řád Clostridiales (52,13 % celkové mikrobioty), z toho čeleď *Lachnospiraceae* (32,83 % celkové mikrobioty) a čeleď *Ruminococcaceae* (13,08 % celkové mikrobioty). Druhým nejpočetnějším kmenem mikrobioty je kmen Bacteroidetes zastoupen jedinou třídou Bacteroidia a jediným řádem Bacteroidales, který tvoří 20,52 % celkové mikrobioty. Nejpočetnější čeledí tohoto kmene je čeleď *Bacteroidaceae*, která tvoří u pacientů před transplantací 14,02 % celkové mikrobioty. Naopak vesměs nežádoucí zástupci třídy Bacilli (zejména čeledi *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae* a *Staphylococcaceae*) tvoří pouze 3,62 % celkové mikrobioty a potenciálně patogenní zástupci kmene Proteobacteria představují u pacientů před transplantací 4,18 % celkové mikrobioty.

Zcela odlišná situace nastává u pacientů po transplantaci, kdy dochází k výraznému úbytku všech čeledí dominujících v mikrobiotě pacientů před transplantací a zároveň k dramatickému zvýšení podílu a dominance prve minoritních mikroorganismů. Konkrétně u pacientů po transplantaci dominuje třída Bacilli (36,91 % celkové mikrobioty) z toho řád

Lactobacillales (35,57 % celkové mikrobioty), čeleď *Enterococcaceae* (24,88 % celkové mikrobioty). Právě tato čeleď, která je po transplantaci dominantní, zaznamenává vlivem léčebného procesu výrazný nárůst, neboť před transplantací je její zastoupení v mikrobiotě pouhých 0,70 %. Naopak zastoupení třídy Clostridia se po transplantaci snížilo z původních 52,13 % na 27,22 % a její nejpočetnější čeleď *Lachnospiraceae* tvořila po transplantaci pouze 17,01 % celkové mikrobioty. Stejně tak se snížilo i zastoupení dalších početných čeledí *Bacteroidaceae* z 14,02 % na 9,51 % a *Ruminococcaceae* z 13,80 % na 7,66 %. Naopak zastoupení patogenních zástupců kmene Proteobacteria se v důsledku transplantace příliš nezměnilo, z původních 4,18 % se nepatrně zvýšilo na 4,87 %.

### 6.3.2. Detailní hodnocení změny mikrobioty v důsledku transplantace

Jelikož obecné výsledky experimentu poukázaly na fakt, že změny mikrobioty vlivem transplantace mohou být velmi variabilní, byl následně zkoumán i konkrétní vliv některých faktorů. Při hodnocení efektu různých léčebných režimů byl sledován vliv antibiotické profylaxe, rozdíl mezi myeloablativním a nemyeloablativním režimem a rozdíl při používání PV vůči dalším způsobům výživy. Zároveň byl sledován i stav mikrobioty v souvislosti s následným rozvojem GVHD a s úmrtím pacientů po transplantaci. Při sledování vlivu jednotlivých faktorů byl hodnocen zejména reziduální obsah prospěšných zástupců kmene Firmicutes třídy Clostridia řádu Clostridiales (zejména čeledí *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*), dále nárůst obsahu nežádoucích prozánětlivých čeledí *Enterococcaceae* a *Streptococcaceae* (třída Bacilli, řád Lactobacillales) a také přítomnost patogenních bakterií kmene Proteobacteria (zejména čeledi *Enterobacteriaceae*). Všechny výsledky hodnocení jsou uvedeny v Příloze 2 (str. III).

Mikrobiota pacientů po transplantaci byla obecně charakterizována výrazným nárůstem nežádoucí čeledi *Enterococcaceae* a naopak snížením prospěšných zástupců čeledí *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*. Zvýšený podíl nežádoucích bakterií byl výraznější u pacientů bez antibiotické profylaxe, kdy čeleď *Enterococcaceae* po transplantaci tvořila 9,22 % celkové mikrobioty oproti pacientům s antibiotickou profylaxí (6,42 %). Podobně se nepřítomnost antibiotik projevila i v zastoupení čeledi *Streptococcaceae* (2,88 % u skupiny s antibiotickou profylaxí oproti 10,29 % u skupiny bez antibiotik). Naopak v zastoupení prospěšných čeledí *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* nebyl ve skupině s antibiotiky a bez antibiotické profylaxe shledán významný rozdíl (29,51 % vůči 31,34 % pro čeleď *Lachnospiraceae* a 13,42 % vůči 12,83 % pro čeleď *Ruminococcaceae*). V případě zastoupení patogenního kmene Proteobacteria, konkrétně čeledi *Enterobacteriaceae*, byl shledán mírný nárůst u pacientů s antibiotickou profylaxí (2,01 %) oproti pacientům bez antibiotické profylaxe (1,46 %). I přes mírně zvýšené zastoupení těchto patogenních bakterií byl celkový vliv antibiotické profylaxe v tomto experimentu spíše pozitivní, antibiotika zřejmě zmírnily navýšení nežádoucích čeledí *Enterococcaceae* a *Streptococcaceae* bez výraznějšího vlivu na zastoupení žádoucích čeledí *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*.

Při porovnání pacientů s myeloablativním režimem oproti pacientům s režimem RIC

(nemyeloablativní) byl shledán významný rozdíl zejména v zastoupení čeledi *Enterococcaceae*, která tvořila 9,14 % celkové mikrobioty u pacientů s myeloablativním režimem a 16,07 % u pacientů s režimem RIC. V případě čeledi *Streptococcaceae* nebyl rozdíl mezi oběma režimy významný. Pacienti s myeloablativním režimem měli zároveň i mírně vyšší zastoupení řádu Clostridiales (42,81 % oproti 38,36 %). Oproti tomu si pacienti s RIC režimem vedli lépe vzhledem k zastoupení čeledi *Enterobacteriaceae*, která u nich tvořila 2,04 % celkové mikrobioty vůči 3,20 % u pacientů s myeloablativním režimem. Celkově mírně lepší výsledky poskytl myeloablativní režim (menší nárůst nežádoucích bakterií a zachování vyššího procenta prospěšných bakterií), jeho nevýhodou je ovšem mírné navýšení potenciální patogenů.

Význam podávání PV na skladbu mikrobioty nebyl jednoznačný. Z běžných mikrobiálních zástupců měli pacienti s PV prakticky stejný podíl zástupců třídy Clostridia (40,90 %) vůči pacientům bez PV (40,42 %), ale o trochu vyšší podíl bakterií třídy Bacteroidia (20,64 % vůči 17,52 % u pacientů bez PV). Naopak výskyt převážně nežádoucích zástupců třídy Bacilli (do kterého patří opakovaně zmiňované čeledi *Enterococcaceae* a *Streptococcaceae*) byl u pacientů s PV mírně nižší (17,44 %) než u pacientů bez PV (20,39 %). Zároveň však byl u pacientů s PV pozorován i vyšší výskyt nejen patogenní čeledi *Enterobacteriaceae* (3,41 % oproti 1,90 %), ale zároveň i celého nežádoucího kmene Proteobacteria (5,20 % vůči 3,20 %), do něhož tato čeleď spadá. Výsledky tedy napovídají, že užívání PV je u pacientů spojeno s vyšším podílem patogenní mikrobioty. Ovšem nelze jednoznačně soudit, že zvýšený podíl patogenů je důsledkem podávání PV. Může se totiž jednat pouze o doprovodný jev, kdy je pravděpodobné, že pacient, jehož mikrobiota vykazuje vyšší zastoupení patogenů, bude po alog-HSCT celkově v horším nutričním stavu, a bude tedy spíše indikován k PV než pacient, jehož mikrobiota má po transplantaci celkově vyšší zastoupení protektivních bakterií.

Výskyt relapsu u pacientů po transplantaci byl jednoznačně spojen s některými patogenními vzorci ve skladbě mikrobioty. U běžných komenzálů čeledi *Bacteroidales* bylo zastoupení sice vyšší (22,35 %) než u pacientů bez relapsu (17,13 %), ovšem pozitivní řád Clostridiales byl u těchto pacientů významně snížen (33,12 %) oproti pacientům bez relapsu (43,39 %). Zároveň zastoupení nežádoucího řádu Lactobacillales bylo u pacientů s relapsem opět vyšší (24,18 % oproti 15,80 %), stejně jako v případě patogenní čeledi *Enterobacteriales*, která tvořila dokonce 6,89 % oproti 1,80 % u pacientů bez relapsu. Spojitost relapsu s úbytkem protektivních bakterií při současném výrazném nárůstu patogenů je zde očividná.

Podobně byla patogenní struktura mikrobioty po transplantaci nápadná i u pacientů, u nichž došlo k úmrtí. Protektivní řád Clostridiales měl u těchto pacientů významně nižší zastoupení (35,96 % celkové mikrobioty) než u pacientů, u nichž k úmrtí nedošlo (42,42 %). Naopak nežádoucí zástupci řádu Lactobacillales byli u pacientů, u nichž došlo k úmrtí, zastoupeni ve výrazně vyšší míře, než tomu bylo u ostatních pacientů (25,25 % oproti 15,87 %). Stejně tak byl v případě úmrtí významně vyšší i podíl patogenního kmene Proteobacteria (7,44 % vůči 4,20 %).

Určité rozdíly byly shledány i při porovnání pacientů s následným rozvojem GVHD oproti pacientům bez GVHD. Z běžných komenzálních druhů byl u pacientů s GVHD významně snížen protektivní řád Clostridiales (34,40 % vůči 42,47 %), stejně jako řád Bacteroidales (6,48 % oproti 16,85 %). U nežádoucího řádu Lactobacillales byl ve skupině pacientů s GVHD pozorován naopak pokles na 8,85 % oproti pacientům bez GVHD, u nichž tento řád tvořil 15,83 % celkové mikrobioty. Z nežádoucích bakterií byl pozorován rozdíl zejména v zastoupení čeledi *Staphylococcaceae*, která u pacientů s GVHD tvořila 21,00 %, zatímco u pacientů bez GVHD byla zastoupena pouze z 0,13 %. Podobně dramatický rozdíl byl shledán i v případě čeledi *Actinomycetaceae* kmene Actinobacteria, která u pacientů bez GVHD tvořila pouhých 0,53 %, ovšem při rozvoji GVHD bylo její zastoupení 17,17 % z celkové mikrobioty.

## 7. Diskuse

V posledních desetiletích byla u pacientů po alo-HSCT prokázána souvislost mezi zastoupením některých mikrobiálních skupin střevní mikrobioty a úmrtností, relapsem onemocnění, rizikem infekce a rozvojem GVHD. Většina těchto studií má však stále omezený rozsah, údaje z nich jsou uváděny jedním centrem a mnohé vychází z preklinických modelů.

Složení střevní mikrobioty je za fyziologických podmínek ovlivněno mnoha faktory včetně vlivu složek potravy, které mimo jiné vychází ze stravovacích zvyklostí každé země. Stejně tak je významně ovlivněna mikrobiota pacientů před transplantací farmakologickými postupy, zejména antibiotickou a chemoterapeutickou léčbou společně s ozařováním, které jsou indikovány v rámci standardních postupů na jednotlivých pracovištích. Cílem této práce bylo zjistit a porovnat změny mikrobioty, ke kterým dochází u pacientů, kteří podstoupili alo-HSCT v ÚHKT Praha.

Na základě stanovení mikrobiální diversity pomocí NGS analýzy a po vyhodnocení statistických testů určujících biodiversitu společenstva mikrobioty bylo ve skupině pacientů našeho experimentu prokázáno, že u většiny z nich dochází po alo-HSCT k významným změnám ve složení jejich střevní mikrobioty. Zatímco před transplantací se střevní mikrobiota pacientů vyznačuje rozmanitostí se zastoupením variabilních bakteriálních kmenů, po transplantaci u většiny z nich dochází ke snížení diversity s nadvládou jednoho z bakteriálních taxonů. Snížení diversity mikrobioty v důsledku alo-HSCT je dobře známým jevem, který shodně popisují různé literární zdroje (220, 227). Problematika snížené diversity po alo-HSCT představuje riziko pro následnou léčbu pacientů, jak popisují Taur et al. (2014) ve své klinické studii, ve které srovnávají střevní diversitu u 80 pacientů po transplantaci s jejím vlivem na OS (overall survival) a TRM (treatment related mortality). Pomocí inverzního Simpsonova indexu byla odhadnuta diversita a následně autor rozděluje pacienty do tří skupin s nízkou, střední a vysokou diversitou mikrobioty. Ukázalo se, že nízká GI diversita je silně asociována se snížením OS do tří let po transplantaci (36, 60 a 67 %). V závěru své práce uvádí, že snížená mikrobiální diversita je nejen nezávislým prediktorem úmrtnosti u alo-HSCT příjemců, ale může mít vliv i na její případný úspěch či neúspěch. Navíc narušená a snížená diversita přispívá často k nadvládě bakterií jednoho či více kmenů, které jsou spojeny s následným rozvojem bakterémie a s ní spojenými komplikacemi po transplantaci (227).

Ve vyšetřované skupině pacientů se potvrdilo, že kmeny přítomné po transplantaci jsou méně různorodé, pravděpodobně v souvislosti s úbytkem některých rodů, či druhů (viz výsledky dílčích statistických testů biodiversity). Významná byla zejména posttransplantační dominance třídy Bacilli, především čeledi *Enterococcaceae* s mírným nárůstem čeledi *Streptococcaceae*. Dominance rodu *Enterococcus* u pacientů po transplantaci se tak shoduje s tím, co uvádí literatura (214, 220). Dále byl pozorován úbytek třídy Clostridia, konkrétně řádu Clostridiales, jehož pokles po transplantaci byl téměř 2násobný. To potvrzuje i odborná literatura (214, 220), která zároveň upozorňuje na možný negativní dopad snížení těchto

bakterií na další vývoj onemocnění (211-213, 215, 227, 265). Třída Clostridia totiž představuje významné producenty SCFA, zejména butyrátu, které mají významný protizánětlivý efekt, podílí se na ochraně střevních epitelových buněk a na udržení integrity střevní mukózní vrstvy (137, 139, 140). I z tohoto důvodu jsou pacienti v období po transplantaci ohroženi rozvojem systémových bakteriálních infekcí, ke kterým dochází často vlivem narušení slizniční bariéry, která umožňuje komenzálním mikrobům proniknout do podslizniční vrstvy a do krevního oběhu (309). Mezi nejčastější vyvolavatele těchto infekcí patří vancomycin-rezistentní *Enterococcus* (VRE), *Streptococcus* a aerobní G-bakterie (310–312). Studie zabývající se vlivem intestinální dominance na rozvoj bakteriémie potvrzují, že zejména hojnější zastoupení čeledi *Lachnospiraceae* je obecně spojeno s nižší letalitou u pacientů po alo-HSCT (215, 227).

Většině pacientů je ještě před zahájením transplantace indikována antibiotická profylaxe zejména antibiotiky ze skupiny fluorochinolonů (ciprofloxacin). Použití profylaktické léčby ciprofloxacinem slouží k prevenci infekce krevního řečiště, která souvisí s chemoterapií a transplantací, a patří mezi zavedené postupy (307). Užívání antibiotické profylaxe v našem experimentu bylo spojeno se sníženým nárůstem třídy Bacilli, zejména čeledí *Enterococcaceae* a *Streptococcaceae*, zatímco zastoupení řádu Clostridiales nebylo vlivem podávání antibiotik výrazně ovlivněno. Tyto výsledky napovídají, že antibiotická profylaxe pravděpodobně může mít příznivý vliv na zachování řádu Clostridiales a zároveň působit proti rozvoji intestinální dominance u čeledí *Enterococcaceae* a *Streptococcaceae*, které patří mezi časté vyvolavatele bakteremií u pacientů po HSCT. Příznivé účinky antibiotické profylaxe v prevenci posttransplantačních komplikací potvrzuje i odborná literatura (220, 307). Ovšem některé studie uvádí, že léčba ciprofloxacinem byla nejen u pacientů po alo-HSCT, ale i u zdravých jedinců spojena se snížením bakteriální diversity a úbytkem řádu Clostridiales (*Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*), což ukazuje na narušení diversity těmito antibiotiky (100, 308). To se v naší studii nepotvrdilo, úbytek řádu Clostridiales byl v našem experimentu pozorován až po transplantaci, nikoliv vlivem podávání antibiotik. Nejednoznačný je i vliv podávání antibiotik na podíl patogenních bakterií z kmene Proteobacteria. Zatímco některé studie uvádí protektivní vliv podávání fluorochinolonových antibiotik na dominanci tohoto kmene (220, 228), jiná studie uvádí spojitost léčby ciprofloxacinem u některých pediatrických i dospělých pacientů s alo-HSCT s nárůstem třídy Gammaproteobacteria (308). Ten je považován jednoznačně za nepříznivý, především z hlediska rizika rozvoje postransplantačních komplikací a úmrtí u transplantovaných pacientů (220). Mírný nárůst čeledi *Enterobacteriaceae* byl pozorován i v rámci našeho experimentu (o 0,55 %), nelze však jednoznačně soudit, zda může být toto navýšení klinicky významné.

Srovnávání dvou přípravných režimů v našem experimentu poukázalo na mírně lepší výsledky u myeloablativního režimu, který byl spojen se sníženým nárůstem bakterií čeledi *Enterococcaceae* a s lepším zachováním řádu Clostridiales. Oproti tomu výhoda nemyeloablativního režimu RIC spočívá zejména ve snížené toxicitě a důraznější



imunosupresi (dvojitá imunosuprese, kombinace ciclosporinu A a mykofenolát mofetilu – MMF) (207). Odborná literatura ovšem uvádí, že kombinace některých imunosupresiv může být spojena se zvýšenou kolonizací například *E.coli* a *Enterococcus* spp. (315). Navíc léčba MMF u myši byla spojena se změnami ve střevním mikrobiálním složení, se ztrátou celkové rozmanitosti s následnou expanzí některých nežádoucích bakteriálních kmenů (316). Tento vliv byl patrný i ve výsledcích našeho experimentu, který poukázal na možný nepříznivý vliv na skladbu střevní mikrobioty v důsledku RIC režimu. Na druhou stranu nesporně pozitivním vlivem tohoto režimu byl naopak snížený podíl čeledi *Enterobacteriaceae*.

Vliv podávání PV na skladbu mikrobioty zkoumaný v našem experimentu nebyl jednoznačný. Podíl řádu Clostridiales nebyl podáváním PV významně ovlivněn, u nežádoucích zástupců třídy Bacilli byl zaznamenán spíše pozitivní efekt vlivem jejich sníženého nárůstu, zatímco u patogenů z kmene Proteobacteria byl evidentní zvýšený podíl. Naše výsledky tudíž nepoukazují jednoznačně na negativa či pozitiva podávání PV. Odborná literatura oproti tomu uvádí spíše negativní následky podávání PV, zejména je-li dlouhodobá. Dlouhodobé podání PV po transplantaci často vede k atrofii střevní sliznice s možným dopadem na složení střevní mikrobioty a produkci protektivních SCFA (215, 237, 313, 314), jak bylo pozorováno např. v důsledku úbytku prospěšného druhu *Blautia* z čeledi *Lachnospiraceae* vlivem dlouhodobého podávání PV (235, 236). V jiných studiích byl navíc prokázán vliv podávání PV na celkově vyšší výskyt akutní GVHD a horší přežití (242, 261). Pro vyšší riziko komplikací a horší přežití by svědčil v našem experimentu pozorovaný zvýšený výskyt patogenních bakterií kmene Proteobacteria, neboť tento kmen je prokazatelně spojen s různými komplikacemi a vyšší mortalitou (220, 222, 227). Ovšem jak již bylo uvedeno v kapitole Výsledky, nelze v našem případě jednoznačně soudit, zda je zvýšený podíl těchto patogenů skutečně důsledkem podávání PV, nebo pouze přidruženým jevem. Navíc prokazatelnost výsledků podávání PV v našem experimentu byla pravděpodobně ovlivněna malým počtem účastníků studie a přílišnou heterogenitou souboru pacientů s PV. Doba podávání PV u pacientů v našem experimentu se pohybovala v rozmezí od 3 do 30 dnů s mediánem 6 dní, přičemž právě doba podávání PV významně ovlivňuje riziko komplikací, které je prokazatelně vyšší zejména při dlouhodobém podávání PV (nad 10 dní) (235, 236). Je tedy pravděpodobné, že soubor pacientů v našem experimentu není pro hodnocení negativních dopadů podávání PV vhodný, a může tudíž spíše odrážet mírně pozitivní efekt krátkodobého podávání PV.

V případě závažných následků alo-HSCT, konkrétně relapsu a úmrtí, byl u pacientů v našem souboru v obou případech shodně pozorován jednoznačný úbytek protektivních Clostridiales, vyšší podíl nežádoucích Lactobacillales a výrazný nárůst patogenních Gammaproteobacteria. Tento charakteristický dysbiotický obraz mikrobioty v sobě spojuje oslabený protektivní vliv řádu Clostridiales (211–213, 215, 227, 265) s následným narušením slizniční bariéry (309), zvýšené riziko střevního zánětu a bakterémie vlivem účinků řádu Lactobacillales (214, 220) a vyšší pravděpodobnost rozvoje posttransplantačních komplikací v důsledku nárůstu třídy Gammaproteobacteria (220, 222, 227). V případě relapsu bylo jeho

zvýšené riziko popsáno v souvislosti s kolonizací vancomycin-rezistentním rodem *Enterococcus* (řád Lactobacillales) nebo G<sup>-</sup> bakteriemi (třída Gammaproteobacteria) v období engraftmentu u pacientů po alo-HSCT (221). V případě úmrtí byla prokázána souvislost s deplecí anaerobních komenzálních bakterií řádu Clostridiales (270), se systémovými infekcemi vancomycin-rezistentním rodem *Enterococcus* či oportunním patogenem *Clostridium difficile* (275) a s vyšším zastoupením třídy Gammaproteobacteria (227). V tomto ohledu jsou výsledky našeho experimentu plně v souladu s poznatky uvedenými v odborné literatuře.

Výskyt GVHD dává odborná literatura do souvislosti se stejným obrazem mikrobioty, jako byl v našem experimentu pozorován v případě relapsu a úmrtí – úbytek Clostridiales a nárůst rodu *Enterococcus* (řád Lactobacillales) a třídy Gammaproteobacteria (211–214). Ovšem v našich výsledcích tento typický obraz patrný nebyl. Z těchto faktorů byl v našem experimentu pozorován pouze významný úbytek řádu Clostridiales, který tak byl ve shodě s odbornou literaturou (214, 215, 227). Kromě toho byl u pacientů s GVHD v našem experimentu pozorován i úbytek dalšího komenzálního řádu Bacteroidales. Stejně jako Clostridiales má i tento řád protektivní charakter proti rozvoji dominance rodu *Enterococcus* (228). U řádu Lactobacillales byl však pozorován spíše opačný trend, kdy u pacientů s GVHD bylo zastoupení tohoto řádu nižší. Zajímavými výsledky však bylo dramatické navýšení čeledí *Staphylococcaceae* a *Actinomycetaceae*, které byly u pacientů bez GVHD výrazně minoritní. Zvýšené zastoupení čeledi *Staphylococcaceae* (třída Bacilli, řád Bacillales) není odbornou literaturou v souvislosti s GVHD popisováno, ale vzhledem k charakteru čeledi se dá předpokládat, že její účinek bude podobně nežádoucí jako u příbuzných bakterií čeledí *Enterococcaceae* a *Streptococcaceae* (třída Bacilli, řád Lactobacillales). V případě vysokého zastoupení čeledi *Actinomycetaceae*, však není účinek na GVHD jednoznačný, tato čeleď resp. řád Actinomycetales je v odborné literatuře spíše spojován s ochranným účinkem vůči vzniku GVHD (227). Zvýšené zastoupení čeledi *Actinomycetaceae* u pacientů s GVHD ovšem zaznamenali také Golob et al. (2017), kteří uvádí, že tato atypická asociace *Actinomycetaceae* s GVHD nebyla doposud popsána. Autoři se domnívají, že v tomto případě se však nejedná o zástupce střevní mikrobioty, ale o původně orální mikrobiotu, u níž došlo vlivem léčby při alo-HSCT k přesunu z úst do nižších sekcí GI traktu. Mechanismus, který hraje roli v tomto přesunu, není známý, ale mohl by souviset např. s nutričním režimem (podávání PV, nebo EV) či s užíváním antacid. Autoři dále uvádí, že patogenita či možný vliv čeledi *Actinomycetaceae* na výskyt GVHD je nepravděpodobný a spíše než o jeho vyvolavatele se jedná o bioindikátor zvýšeného rizika GVHD, neboť poukazuje na možný přesun patogenů z jiných částí GI traktu (317). Tomuto tvrzení by nasvědčoval i výrazný podíl čeledi *Staphylococcaceae* pozorovaný v naší studii. Tato čeleď je totiž prokazatelně běžným zástupcem orální mikrobioty (318), a je tedy možné, že stejně jako v případě čeledi *Actinomycetaceae* došlo k jejímu přesunu do GI traktu vlivem léčebného procesu po alo-HSCT. V tomto ohledu tedy výsledky našeho experimentu podporují domněnku autorů Golob et al. (2017), ovšem vzhledem k absenci jiné literatury by bylo zapotřebí dalších studií pro potvrzení tohoto efektu.

## 8. Závěr

V našem experimentu se podařilo prokázat, že střevní mikrobiota pacientů po alo-HSCT je charakterizována sníženou diversitou, úbytkem řádu Clostridiales a zvýšeným zastoupením potenciálně patogenního rodu *Enterococcus*. Zároveň byl pozorován i mírný nárůst patogenních bakterií třídy Gammaproteobacteria. Tyto změny v mikrobiotě u pacientů po transplantaci mohou negativně ovlivňovat prognózu a naději na dožití, neboť jsou častými vyvolavateli závažných posttransplantačních komplikací. V souvislosti s tím probíhá intenzivní výzkum možných strategií zaměřených na modulaci střevní mikrobioty pacientů. Negativní vliv na rozmanitost mikrobioty má zejména antibiotická profylaxe, která je však důležitou a nezbytnou součástí léčby po alo-HSCT, a nelze ji tudíž z léčby vynechat.

Jedním z cílů současného výzkumu je tudíž minimalizace negativních dopadů antibiotické léčby na stav mikrobioty pacientů. Ten zkoumá například možnosti využití neinvazivních biomarkerů stavu mikrobioty (3-indoxyl sulfát v moči, sérová koncentrace Reg 3alfa, fekální hladiny alfa defensinů), jejichž pravidelný monitoring v průběhu antibiotické profylaxe vypovídá o aktuálních změnách složení mikrobioty, a může tak sloužit jako nástroj pro průběžnou úpravu dávek antibiotik. Kromě toho může tento monitoring úspěšně predikovat rozvoj GVHD, a zlepšovat tak prognózu pacientů díky včasnému nasazení léčby.

Vedle minimalizace dopadů antibiotické léčby jsou v současné době intenzivně zkoumány možnosti obnovy mikrobioty u pacientů po transplantaci. Velmi slibnou léčebnou strategií je nově možnost transplantace fekální mikrobioty, která je dobře tolerována a účinně obnovuje komenzální bakteriální populaci v kritickém časném stádiu imunitní rekonstituce po alo-HSCT. Představuje tudíž efektivní nástroj pro snížení frekvence posttransplantačních komplikací a úmrtnosti pacientů po alo-HSCT. Nadějně výsledky poskytují také některé malé studie věnující se podávání probiotik (např. *Lactobacillus brevis*) či prebiotik (inulin, FOS, bramborový škrob), u nichž byl prokázán pozitivní efekt na výskyt, dobu trvání a závažnost některých komplikací (mukozitida, febrilní neutropenie) či na urychlení engraftmentu. Lze tedy očekávat, že ověření těchto závěrů bude v dohledné době předmětem dalšího studia.

Další, často opomíjenou, oblastí ve výzkumu optimalizace léčebných strategií po alo-HSCT jsou možnosti nutriční intervence. Dietní opatření v podobě neutropenické nebo modifikované nízkobakteriální stravy, příjem stravy per os, podávání EV, PV či TPN, monitoring příjmu vlákniny a podávání prebiotik v rámci léčebných režimů představují možnosti pro další výzkum a domníváme se, že zaměření příštích studií na hodnocení této oblasti může být pro celkovou problematiku léčebných strategií při alo-HSCT velkým přínosem.

## 9. Reference

1. Noor, F., et al., *The Gut Microbiota and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Challenges and Potentials*. J Innate Immun, 2019. **11**(5): p. 405-415.
2. Greenhalgh, K., et al., *The human gut microbiome in health: establishment and resilience of microbiota over a lifetime*. Environ Microbiol, 2016. **18**(7): p. 2103-16.
3. Ferrara, J.L., et al., *Altered homeostatic regulation of innate and adaptive immunity in lower gastrointestinal tract GVHD pathogenesis*. J Clin Invest, 2017. **127**(7): p. 2441-2451.
4. Krejsek, J., et al., *Imunologie člověka*. Garamont s.r.o Hradec Králové, 2016: 261-465. ISBN:80-86472-74-4.
5. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
6. Sansonetti, P.J., *To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(1): p. 8-14.
7. Hawrelak, J.A. and S.P. Myers, *The causes of intestinal dysbiosis: a review*. Altern Med Rev, 2004. **9**(2): p. 180-97.
8. Schippa, S., et al., *A potential role of Escherichia coli pathobionts in the pathogenesis of pediatric inflammatory bowel disease*. Can J Microbiol, 2012. **58**(4): p. 426-32.
9. Peterson, D.A., et al., *Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 417-27.
10. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
11. Alou, M.T., Lagier, J.CH, Raoult D., *Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders*. Hum. Microbiome J., 2016. **1**: p. 3-11.
12. Rodrigues, R.R., et al., *Antibiotic-Induced Alterations in Gut Microbiota Are Associated with Changes in Glucose Metabolism in Healthy Mice*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 2306.
13. Nowak-Węgrzyn, A., H. Szajewska, and G. Lack, *Food allergy and the gut*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(4): p. 241-257.
14. Murphy, E.A., K.T. Velazquez, and K.M. Herbert, *Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2015. **18**(5): p. 515-20.
15. Kirsch, M., *Bacterial overgrowth*. Am J Gastroenterol, 1990. **85**(3): p. 231-7.
16. Magge, S. and A. Lembo, *Low-FODMAP Diet for Treatment of Irritable Bowel Syndrome*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2012. **8**(11): p. 739-45.
17. Khor, B., A. Gardet, and R.J. Xavier, *Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2011. **474**(7351): p. 307-17.
18. Eaton, K.K., Howard, M.A., *Fungal-type Dysbiosis of the Gut: The Occurrence of Fungal Diseases and Response to Challenge with Yeasty and Mould containing Foods*. Nutr. Environ, 1998. **8**: p. 247-255.
19. Fiocchi, C., *What is "physiological" intestinal inflammation and how does it differ from "pathological" inflammation?* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14** Suppl 2: p. S77-8.
20. *Histology Guide* [online]. Minneapolis: Universita of Minnesota©2005-2019 Dostupné z: <http://www.histologyguide.com/slidebox/14-gastrointestinal-tract.html>
21. Barker, N., *Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(1): p. 19-33.

22. Vermeulen, L. and H.J. Snippert, *Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(7): p. 468-80.
23. Sasaki, N., et al., *Reg4+ deep crypt secretory cells function as epithelial niche for Lgr5+ stem cells in colon*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(37): p. E5399-407.
24. Odenwald, M.A. and J.R. Turner, *The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target?* Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(1): p. 9-21.
25. Kaetzel, C.S., et al., *The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(19): p. 8796-800.
26. McGuckin, M.A., et al., *Mucin dynamics and enteric pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(4): p. 265-78.
27. Johansson, M.E., et al., *Composition and functional role of the mucus layers in the intestine*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(22): p. 3635-41.
28. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
29. Bevins, C.L. and N.H. Salzman, *Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(5): p. 356-68.
30. Latorre, R., et al., *Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(5): p. 620-30.
31. Banerjee, A., et al., *Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function*. J Clin Invest, 2018. **128**(5): p. 1711-1719.
32. Mabbott, N.A., et al., *Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 666-77.
33. Mowat, A.M., *To respond or not to respond - a personal perspective of intestinal tolerance*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(6): p. 405-415.
34. Macpherson, A.J., et al., *The mucosal firewalls against commensal intestinal microbes*. Semin Immunopathol, 2009. **31**(2): p. 145-9.
35. Hooper, L.V. and A.J. Macpherson, *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 159-69.
36. Cash, H.L., et al., *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1126-30.
37. Kelsall, B., *Recent progress in understanding the phenotype and function of intestinal dendritic cells and macrophages*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(6): p. 460-9.
38. Macpherson, A.J. and N.L. Harris, *Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(6): p. 478-85.
39. Peterson, D.A., et al., *IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 328-39.
40. Lim, H.W., P. Hillsamer, and C.H. Kim, *Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses*. J Clin Invest, 2004. **114**(11): p. 1640-9.
41. Wolk, K. and R. Sabat, *Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells*. Cytokine Growth Factor Rev, 2006. **17**(5): p. 367-80.
42. Josefowicz, S.Z., et al., *Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 395-9.
43. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010.

- 107**(27): p. 12204-9.
44. Geuking, M.B., et al., *Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 794-806.
  45. Peck, A. and E.D. Mellins, *Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example*. *Immunology*, 2010. **129**(2): p. 147-53.
  46. Atarashi, K., et al., *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. *Science*, 2011. **331**(6015): p. 337-41.
  47. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. *Nature*, 2008. **453**(7195): p. 620-5.
  48. Rivas, M.N., et al., *MyD88 is critically involved in immune tolerance breakdown at environmental interfaces of Foxp3-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(5): p. 1933-47.
  49. Brandl, K., et al., *Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits*. *Nature*, 2008. **455**(7214): p. 804-7.
  50. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. *Immunol Rev*, 2000. **173**: p. 89-97.
  51. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. *Immunity*, 2011. **34**(5): p. 637-50.
  52. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(2): p. 131-44.
  53. Motta, V., et al., *NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels*. *Physiol Rev*, 2015. **95**(1): p. 149-78.
  54. Brown, G.D., J.A. Willment, and L. Whitehead, *C-type lectins in immunity and homeostasis*. *Nat Rev Immunol*, 2018. **18**(6): p. 374-389.
  55. Kell, A.M. and M. Gale, Jr., *RIG-I in RNA virus recognition*. *Virology*, 2015. **479-480**: p. 110-21.
  56. Lugrin, J. and F. Martinon, *The AIM2 inflammasome: Sensor of pathogens and cellular perturbations*. *Immunol Rev*, 2018. **281**(1): p. 99-114.
  57. Sun, L., et al., *Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 786-91.
  58. Burgueno, J.F. and M.T. Abreu, *Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020. **17**(5): p. 263-278.
  59. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. *Nature*, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
  60. Schaefer, L., *Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(51): p. 35237-45.
  61. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. *Mol Cell*, 1998. **2**(2): p. 253-8.
  62. Zhang, F.X., et al., *Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(12): p. 7611-4.
  63. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. *Science*, 2003. **301**(5633): p. 640-3.
  64. Yamamoto, M., et al., *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling*. *J Immunol*, 2002. **169**(12): p. 6668-72.

65. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 816-25.
66. Li, X., S. Jiang, and R.I. Tapping, *Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival*. Cytokine, 2010. **49**(1): p. 1-9.
67. Buffie, C.G. and E.G. Pamer, *Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(11): p. 790-801.
68. Kamada, N., et al., *Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota*. Nat Immunol, 2013. **14**(7): p. 685-90.
69. Turovskiy, Y., K. Sutyak Noll, and M.L. Chikindas, *The aetiology of bacterial vaginosis*. J Appl Microbiol, 2011. **110**(5): p. 1105-28.
70. Hammami, R., et al., *Anti-infective properties of bacteriocins: an update*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(16): p. 2947-67.
71. Iwase, T., et al., *Staphylococcus epidermidis Esp inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation and nasal colonization*. Nature, 2010. **465**(7296): p. 346-9.
72. Backhed, F., et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1915-20.
73. Turrioni, F., et al., *Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008. **94**(1): p. 35-50.
74. Zoetendal, E.G., E.E. Vaughan, and W.M. de Vos, *A microbial world within us*. Mol Microbiol, 2006. **59**(6): p. 1639-50.
75. Collins, M.D., et al., *The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations*. Int J Syst Bacteriol, 1994. **44**(4): p. 812-26.
76. Aminov, R.I., et al., *Molecular diversity, cultivation, and improved detection by fluorescent in situ hybridization of a dominant group of human gut bacteria related to Roseburia spp. or Eubacterium rectale*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(9): p. 6371-6.
77. Scott, K.P., Duncan S.H., Flint, H.J., *Dietary fibre and the gut microbiota*. Nutr Bull, 2008. **33**: p. 201-211.
78. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
79. Hold, G.L., et al., *Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis*. FEMS Microbiol Ecol, 2002. **39**(1): p. 33-9.
80. van der Waaij, L.A., et al., *Bacterial population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(10): p. 865-71.
81. Derrien, M., et al., *Akkermansia muciniphila gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 5): p. 1469-1476.
82. Kovatcheva-Datchary, P., Tremaroli P., Bäckhed F., *The Gut Microbiota*. The prokaryotes, 2013: p. 3-24.
83. Frank, D.N., et al., *Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13780-5.
84. Swidsinski, A., et al., *Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(8): p. 1131-40.
85. Jones, M.L., et al., *Emerging science of the human microbiome*. Gut Microbes, 2014. **5**(4): p. 446-57.

86. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011. **473**(7346): p. 174-80.
87. Haller, D., *The Gut Microbiome in Health and Disease*. Springer International Publishing Switzerland 2018. ISBN:978-3-319-90545-7.
88. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(26): p. 11971-5.
89. Dominguez-Bello, M.G., et al., *Development of the human gastrointestinal microbiota and insights from high-throughput sequencing*. Gastroenterology, 2011. **140**(6): p. 1713-9.
90. Zoetendel, E.G., Akkermans, A.D.L., Akkermans-van Vliet, W.M., de Visser, J.A.G.M, de Vos, W.M., *The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract*. Microb.Ecol.Health Dis., 2001. **13**: p. 129-134.
91. Lepage, P., et al., *Twin study indicates loss of interaction between microbiota and mucosa of patients with ulcerative colitis*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 227-36.
92. Schippa, S. and M.P. Conte, *Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health*. Nutrients, 2014. **6**(12): p. 5786-805.
93. Turnbaugh, P.J., et al., *A core gut microbiome in obese and lean twins*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 480-4.
94. Koenig, J.E., et al., *Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4578-85.
95. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
96. Bode, L., *Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond*. Nutr Rev, 2009. **67 Suppl 2**: p. S183-91.
97. Moughan, P.J., et al., *The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants*. World Rev Nutr Diet, 1992. **67**: p. 40-113.
98. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.
99. Dethlefsen, L., et al., *The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing*. PLoS Biol, 2008. **6**(11): p. e280.
100. Dethlefsen, L. and D.A. Relman, *Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4554-61.
101. Jernberg, C., et al., *Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota*. ISME J, 2007. **1**(1): p. 56-66.
102. Biagi, E., et al., *Through ageing, and beyond: gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10667.
103. Biagi, E., et al., *Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart*. Age (Dordr), 2012. **34**(1): p. 247-67.
104. Putignani, L. and B. Dallapiccola, *Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay*. J Proteomics, 2016. **147**: p. 3-20.
105. Chapman - Kiddell, C.A., Davies, P.S., Gillen, L., Radford - Smith, G.L., *Role of diet in the development of inflammatory bowel disease*. Inflamm.Bowel Dis., 2012. **16**: p. 137-151.
106. Hou, J.K., D. Lee, and J. Lewis, *Diet and inflammatory bowel disease: review of*



- patient-targeted recommendations*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014. **12**(10): p. 1592-600.
107. Magee, E.A., et al., *Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans*. Am J Clin Nutr, 2000. **72**(6): p. 1488-94.
  108. Wedlake, L., et al., *Fiber in the treatment and maintenance of inflammatory bowel disease: a systematic review of randomized controlled trials*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(3): p. 576-86.
  109. Carbonero, F., et al., *Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 448.
  110. Dermadi, D., et al., *Western Diet Derregulates Bile Acid Homeostasis, Cell Proliferation, and Tumorigenesis in Colon*. Cancer Res, 2017. **77**(12): p. 3352-3363.
  111. Giannelli, V., et al., *Microbiota and the gut-liver axis: bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(45): p. 16795-810.
  112. Wahlstrom, A., et al., *Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism*. Cell Metab, 2016. **24**(1): p. 41-50.
  113. Duncan, S.H., et al., *Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(4): p. 1073-8.
  114. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-9.
  115. Kurokawa, K., et al., *Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes*. DNA Res, 2007. **14**(4): p. 169-81.
  116. Acheson, D.W. and S. Luccioli, *Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 387-404.
  117. Hooper, L.V., et al., *Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem*. Bioessays, 1998. **20**(4): p. 336-43.
  118. Xu, J. and J.I. Gordon, *Honor thy symbionts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10452-9.
  119. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. EMBO Rep, 2006. **7**(7): p. 688-93.
  120. Cummings, J.H. and H.N. Englyst, *Fermentation in the human large intestine and the available substrates*. Am J Clin Nutr, 1987. **45**(5 Suppl): p. 1243-55.
  121. Ouwehand, A.C., et al., *Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality*. Curr Opin Biotechnol, 2005. **16**(2): p. 212-7.
  122. Hughes, R., E.A. Magee, and S. Bingham, *Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer*. Curr Issues Intest Microbiol, 2000. **1**(2): p. 51-8.
  123. Samuel, B.S. and J.I. Gordon, *A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(26): p. 10011-6.
  124. Flint, H.J., et al., *Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(2): p. 121-31.
  125. Jindou, S., et al., *Cellulosome gene cluster analysis for gauging the diversity of the ruminal cellulolytic bacterium Ruminococcus flavefaciens*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **285**(2): p. 188-94.
  126. Rincon, M.T., et al., *Unconventional mode of attachment of the Ruminococcus*

- flavefaciens* cellulosome to the cell surface. J Bacteriol, 2005. **187**(22): p. 7569-78.
127. Barcenilla, A., et al., *Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1654-61.
  128. Pryde, S.E., et al., *The microbiology of butyrate formation in the human colon*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **217**(2): p. 133-9.
  129. Louis, P., et al., *Restricted distribution of the butyrate kinase pathway among butyrate-producing bacteria from the human colon*. J Bacteriol, 2004. **186**(7): p. 2099-106.
  130. Duncan, S.H., P. Louis, and H.J. Flint, *Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(10): p. 5810-7.
  131. Louis, P., et al., *Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(5): p. 1197-208.
  132. Scott, K.P., et al., *Whole-genome transcription profiling reveals genes up-regulated by growth on fucose in the human gut bacterium "Roseburia inulinivorans"*. J Bacteriol, 2006. **188**(12): p. 4340-9.
  133. Mortensen, P.B. and M.R. Clausen, *Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1996. **216**: p. 132-48.
  134. Scheppach, W., *Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function*. Gut, 1994. **35**(1 Suppl): p. S35-8.
  135. Lavelle, A. and H. Sokol, *Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020. **17**(4): p. 223-237.
  136. Koh, A., et al., *From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites*. Cell, 2016. **165**(6): p. 1332-1345.
  137. Willemsen, L.E., et al., *Short chain fatty acids stimulate epithelial mucin 2 expression through differential effects on prostaglandin E(1) and E(2) production by intestinal myofibroblasts*. Gut, 2003. **52**(10): p. 1442-7.
  138. Maslowski, K.M., et al., *Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43*. Nature, 2009. **461**(7268): p. 1282-6.
  139. Macia, L., et al., *Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6734.
  140. Atarashi, K., et al., *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*. Nature, 2013. **500**(7461): p. 232-6.
  141. Kohler, N. and R. Zeiser, *Intestinal Microbiota Influence Immune Tolerance Post Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Intestinal GVHD*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 3179.
  142. Cummings, J.H., et al., *Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood*. Gut, 1987. **28**(10): p. 1221-7.
  143. Macfarlane, G.T., G.R. Gibson, and J.H. Cummings, *Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon*. J Appl Bacteriol, 1992. **72**(1): p. 57-64.
  144. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids*. J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 235-43.
  145. Le Leu, R.K., et al., *A synbiotic combination of resistant starch and Bifidobacterium lactis facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon*. J Nutr,

2005. **135**(5): p. 996-1001.
146. Bauer-Marinovic, M., et al., *Dietary resistant starch type 3 prevents tumor induction by 1,2-dimethylhydrazine and alters proliferation, apoptosis and dedifferentiation in rat colon*. Carcinogenesis, 2006. **27**(9): p. 1849-59.
  147. Cummings, J.H. and S.A. Bingham, *Dietary fibre, fermentation and large bowel cancer*. Cancer Surv, 1987. **6**(4): p. 601-21.
  148. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(2): p. 104-19.
  149. Sengupta, S., J.G. Muir, and P.R. Gibson, *Does butyrate protect from colorectal cancer?* J Gastroenterol Hepatol, 2006. **21**(1 Pt 2): p. 209-18.
  150. Vanhoutvin, S.A., et al., *The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers*. Neurogastroenterol Motil, 2009. **21**(9): p. 952-e76.
  151. Chambers, A.F., A.C. Groom, and I.C. MacDonald, *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(8): p. 563-72.
  152. Bergman, E.N., *Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species*. Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 567-90.
  153. Cummings, J.H. and G.T. Macfarlane, *The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon*. J Appl Bacteriol, 1991. **70**(6): p. 443-59.
  154. Macfarlane, S., et al., *Proteolysis and amino acid fermentation*. CRC Press, 1995: p. 75-100.
  155. Macfarlane G.T., et al., *The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function*. Raven Press, 1991: p. 51-92.
  156. Bingham, S.A., et al., *Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer?* Carcinogenesis, 1996. **17**(3): p. 515-23.
  157. Cummings, J.H., et al., *The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. I. Changes in bowel habit, bile acid excretion, and calcium absorption*. Am J Clin Nutr, 1979. **32**(10): p. 2086-93.
  158. Muir, J.G., et al., *Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(6): p. 1020-8.
  159. Christl, S.U., G.R. Gibson, and J.H. Cummings, *Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine*. Gut, 1992. **33**(9): p. 1234-8.
  160. Gibson, G.R., G.T. Macfarlane, and J.H. Cummings, *Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut*. J Appl Bacteriol, 1988. **65**(2): p. 103-11.
  161. Schaap, F.G., M. Trauner, and P.L. Jansen, *Bile acid receptors as targets for drug development*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(1): p. 55-67.
  162. Ridlon, J.M., D.J. Kang, and P.B. Hylemon, *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 241-59.
  163. Pols, T.W., et al., *TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading*. Cell Metab, 2011. **14**(6): p. 747-57.
  164. Lorenzo-Zuniga, V., et al., *Oral bile acids reduce bacterial overgrowth, bacterial translocation, and endotoxemia in cirrhotic rats*. Hepatology, 2003. **37**(3): p. 551-7.
  165. Inagaki, T., et al., *Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3920-5.

166. McGarr, S.E., J.M. Ridlon, and P.B. Hylemon, *Diet, anaerobic bacterial metabolism, and colon cancer: a review of the literature*. J Clin Gastroenterol, 2005. **39**(2): p. 98-109.
167. Yoshimoto, S., et al., *Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome*. Nature, 2013. **499**(7456): p. 97-101.
168. Cervenka, I., L.Z. Agudelo, and J.L. Ruas, *Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health*. Science, 2017. **357**(6349).
169. Cote, F., et al., *Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13525-30.
170. Zenewicz, L.A., et al., *Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 947-57.
171. Li, Y., et al., *Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation*. Cell, 2011. **147**(3): p. 629-40.
172. Zelante, T., et al., *Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 372-85.
173. Bansal, T., et al., *The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(1): p. 228-33.
174. Klaenhammer, T.R., et al., *The impact of probiotics and prebiotics on the immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(10): p. 728-34.
175. Flint, H.J., et al., *Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism*. Proc Nutr Soc, 2015. **74**(1): p. 13-22.
176. Aoudia, N., et al., *Biofilms of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus fermentum: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties*. Food Microbiol, 2016. **53**(Pt A): p. 51-9.
177. Rios-Covian, D., et al., *Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 185.
178. Canfora, E.E., J.W. Jocken, and E.E. Blaak, *Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(10): p. 577-91.
179. van Baarlen, P., J.M. Wells, and M. Kleerebezem, *Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli*. Trends Immunol, 2013. **34**(5): p. 208-15.
180. Hegarty, J.W., et al., *Bacteriocin production: a relatively unharnessed probiotic trait?* F1000Res, 2016. **5**: p. 2587.
181. Sanders, M.E., et al., *Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims*. Curr Opin Biotechnol, 2018. **49**: p. 207-216.
182. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol, 1999. **276**(4): p. G941-50.
183. Yan, F., et al., *A Lactobacillus rhamnosus GG-derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor*. J Biol Chem, 2013. **288**(42): p. 30742-51.
184. Kim, N., et al., *Mind-altering with the gut: Modulation of the gut-brain axis with probiotics*. J Microbiol, 2018. **56**(3): p. 172-182.
185. Janik, R., et al., *Magnetic resonance spectroscopy reveals oral Lactobacillus promotion of increases in brain GABA, N-acetyl aspartate and glutamate*. Neuroimage, 2016. **125**: p. 988-995.

186. Reid, G., *Disentangling What We Know About Microbes and Mental Health*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 81.
187. Kotz, C.M., et al., *Factors affecting the ability of a high beta-galactosidase yogurt to enhance lactose absorption*. J Dairy Sci, 1994. **77**(12): p. 3538-44.
188. Costabile, A., et al., *An in vivo assessment of the cholesterol-lowering efficacy of Lactobacillus plantarum ECGC 13110402 in normal to mildly hypercholesterolaemic adults*. PLoS One, 2017. **12**(12): p. e0187964.
189. Li, D., et al., *The gut microbiota: A treasure for human health*. Biotechnol Adv, 2016. **34**(7): p. 1210-1224.
190. Verbeke, K.A., et al., *Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics*. Nutr Res Rev, 2015. **28**(1): p. 42-66.
191. Falony, G., et al., *In vitro kinetic analysis of fermentation of prebiotic inulin-type fructans by Bifidobacterium species reveals four different phenotypes*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(2): p. 454-61.
192. Riviere, A., et al., *Complementary Mechanisms for Degradation of Inulin-Type Fructans and Arabinoxylan Oligosaccharides among Bifidobacterial Strains Suggest Bacterial Cooperation*. Appl Environ Microbiol, 2018. **84**(9).
193. Flint, H.J., et al., *Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut*. Gut Microbes, 2012. **3**(4): p. 289-306.
194. Hamaker, B.R. and Y.E. Tuncil, *A perspective on the complexity of dietary fiber structures and their potential effect on the gut microbiota*. J Mol Biol, 2014. **426**(23): p. 3838-50.
195. Ze, X., et al., *Ruminococcus bromii is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon*. ISME J, 2012. **6**(8): p. 1535-43.
196. Hosseini, E., et al., *Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut*. Nutr Rev, 2011. **69**(5): p. 245-58.
197. Louis, P. and H.J. Flint, *Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine*. FEMS Microbiol Lett, 2009. **294**(1): p. 1-8.
198. Flint, H.J., S.H. Duncan, and P. Louis, *The impact of nutrition on intestinal bacterial communities*. Curr Opin Microbiol, 2017. **38**: p. 59-65.
199. Chen, T., et al., *Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides-dominated gut microbiota*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2594.
200. Vulevic, J., et al., *Modulation of the fecal microflora profile and immune function by a novel trans-galactooligosaccharide mixture (B-GOS) in healthy elderly volunteers*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(5): p. 1438-46.
201. Vulevic, J., et al., *Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons*. Br J Nutr, 2015. **114**(4): p. 586-95.
202. Moro, G., et al., *A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age*. Arch Dis Child, 2006. **91**(10): p. 814-9.
203. Goss, S.L., et al., *Determination of calcium salt solubility with changes in pH and P(CO<sub>2</sub>), simulating varying gastrointestinal environments*. J Pharm Pharmacol, 2007. **59**(11): p. 1485-92.
204. Kanauchi, O., A. Andoh, and K. Mitsuyama, *Effects of the modulation of microbiota on the gastrointestinal immune system and bowel function*. J Agric Food Chem, 2013.

- 61**(42): p. 9977-83.
205. Stoddart, L.A., N.J. Smith, and G. Milligan, *International Union of Pharmacology. LXXI. Free fatty acid receptors FFA1, -2, and -3: pharmacology and pathophysiological functions*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(4): p. 405-17.
  206. Chambers, E.S., D.J. Morrison, and G. Frost, *Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms?* Proc Nutr Soc, 2015. **74**(3): p. 328-36.
  207. Cetkovský, P., et al., *Transplantace kostní dřeně a periferních hematopoetických buněk*, Galén Praha 2016. ISBN:978-80-7492-267-1.
  208. Magenau, J., L. Runaas, and P. Reddy, *Advances in understanding the pathogenesis of graft-versus-host disease*. Br J Haematol, 2016. **173**(2): p. 190-205.
  209. Washington, K. and M. Jagasia, *Pathology of graft-versus-host disease in the gastrointestinal tract*. Hum Pathol, 2009. **40**(7): p. 909-17.
  210. Jones, J.M., R. Wilson, and P.M. Bealmeear, *Mortality and gross pathology of secondary disease in germfree mouse radiation chimeras*. Radiat Res, 1971. **45**(3): p. 577-88.
  211. Jenq, R.R., et al., *Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation*. J Exp Med, 2012. **209**(5): p. 903-11.
  212. Eriguchi, Y., et al., *Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of alpha-defensins*. Blood, 2012. **120**(1): p. 223-31.
  213. Heimesaat, M.M., et al., *MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease*. Gut, 2010. **59**(8): p. 1079-87.
  214. Holler, E., et al., *Metagenomic analysis of the stool microbiome in patients receiving allogeneic stem cell transplantation: loss of diversity is associated with use of systemic antibiotics and more pronounced in gastrointestinal graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2014. **20**(5): p. 640-5.
  215. Jenq, R.R., et al., *Intestinal Blautia Is Associated with Reduced Death from Graft-versus-Host Disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2015. **21**(8): p. 1373-83.
  216. Levine, J.E., et al., *Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality*. Blood, 2013. **122**(8): p. 1505-9.
  217. Navari, R.M., et al., *Prophylaxis of infection in patients with aplastic anemia receiving allogeneic marrow transplants*. Am J Med, 1984. **76**(4): p. 564-72.
  218. Peled, J.U., et al., *Intestinal Microbiota and Relapse After Hematopoietic-Cell Transplantation*. J Clin Oncol, 2017. **35**(15): p. 1650-1659.
  219. Tamburini, F.B., et al., *Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome*. Nat Med, 2018. **24**(12): p. 1809-1814.
  220. Taur, Y., et al., *Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Infect Dis, 2012. **55**(7): p. 905-14.
  221. Ford, C.D., et al., *Vancomycin-Resistant Enterococcus Colonization and Bacteremia and Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcomes*. Biol Blood Marrow Transplant, 2017. **23**(2): p. 340-346.
  222. Harris, B., et al., *Gut Microbiota Predict Pulmonary Infiltrates after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation*. Am J Respir Crit Care Med, 2016. **194**(4): p. 450-63.

223. Taur, Y., et al., *Role of intestinal microbiota in transplantation outcomes*. Best Pract Res Clin Haematol, 2015. **28**(2-3): p. 155-61.
224. Rup, L., *The human microbiome project*. Indian J Microbiol, 2012. **52**(3): p. 315.
225. Kyle, U.G., et al., *Longitudinal follow-up of body composition in hematopoietic stem cell transplant patients*. Bone Marrow Transplant, 2005. **35**(12): p. 1171-7.
226. Shono, Y., et al., *Intestinal microbiota-related effects on graft-versus-host disease*. Int J Hematol, 2015. **101**(5): p. 428-37.
227. Taur, Y., et al., *The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2014. **124**(7): p. 1174-82.
228. Ubeda, C., et al., *Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans*. J Clin Invest, 2010. **120**(12): p. 4332-41.
229. Alonso, C.D. and K.A. Marr, *Clostridium difficile infection among hematopoietic stem cell transplant recipients: beyond colitis*. Curr Opin Infect Dis, 2013. **26**(4): p. 326-31.
230. Willems, L., et al., *Clostridium difficile infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, risk factors, and outcome*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(8): p. 1295-301.
231. Buffie, C.G., et al., *Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to Clostridium difficile*. Nature, 2015. **517**(7533): p. 205-8.
232. Cotillard, A., et al., *Dietary intervention impact on gut microbial gene richness*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 585-8.
233. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 559-63.
234. Krezalek, M.A., Yeh A., Alverdy J.C., , *Influence of nutrition therapy on the intestinal microbiome*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2016. **20**: p. 131-137.
235. Mack, I., et al., *Is the Impact of Starvation on the Gut Microbiota Specific or Unspecific to Anorexia Nervosa? A Narrative Review Based on a Systematic Literature Search*. Curr Neuropharmacol, 2018. **16**(8): p. 1131-1149.
236. Seitz, J., et al., *The Impact of Starvation on the Microbiome and Gut-Brain Interaction in Anorexia Nervosa*. Front Endocrinol (Lausanne), 2019. **10**: p. 41.
237. Alpers, D.H., *Enteral feeding and gut atrophy*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(6): p. 679-83.
238. Azarnoush, S., et al., *Enteral nutrition: a first option for nutritional support of children following allo-SCT?* Bone Marrow Transplant, 2012. **47**(9): p. 1191-5.
239. Gonzales, F., et al., *Better early outcome with enteral rather than parenteral nutrition in children undergoing MAC allo-SCT*. Clin Nutr, 2018. **37**(6 Pt A): p. 2113-2121.
240. Guieze, R., et al., *Enteral versus parenteral nutritional support in allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation*. Clin Nutr, 2014. **33**(3): p. 533-8.
241. Hopman, G.D., et al., *Tube feeding and bone marrow transplantation*. Med Pediatr Oncol, 2003. **40**(6): p. 375-9.
242. Seguy, D., et al., *Enteral feeding and early outcomes of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation following myeloablative conditioning*. Transplantation, 2006. **82**(6): p. 835-9.
243. Schulte, C., et al., *Low T3-syndrome and nutritional status as prognostic factors in patients undergoing bone marrow transplantation*. Bone Marrow Transplant, 1998. **22**(12): p. 1171-8.
244. August, D.A. and M.B. Huhmann, *A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support*

- therapy during adult anticancer treatment and in hematopoietic cell transplantation.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2009. **33**(5): p. 472-500.
245. Bozzetti, F., et al., *ESPEN Guidelines on Parenteral Nutrition: non-surgical oncology.* Clin Nutr, 2009. **28**(4): p. 445-54.
  246. Apperley, J., et al., *EBMT-ESH Handbook ESH.* Paris, France, 2002, pp 156-175.
  247. Murray, S.M. and S. Pindoria, *Nutrition support for bone marrow transplant patients.* Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD002920.
  248. Botti, S., et al., *Nutritional support in patients undergoing haematopoietic stem cell transplantation: a multicentre survey of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO) transplant programmes.* Ecantermedicalscience, 2015. **9**: p. 545.
  249. Fuji S., M.T., Vincent L., *A multi - center international survey related to the nutritional support after hematopoietic stem cell transplantation endorsed by the ASIA Pacific Blood and Marrow Transplantation (APBMT).* Food Nutr Sci, 2012. **3**: p. 417-421.
  250. Andersen, S., et al., *Implementation of an evidenced based nutrition support pathway for haematopoietic progenitor cell transplant patients.* Clin Nutr, 2015. **34**(3): p. 536-40.
  251. Sucak, G.T., et al., *The role of body mass index and other body composition parameters in early post-transplant complications in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation with busulfan-cyclophosphamide conditioning.* Int J Hematol, 2012. **95**(1): p. 95-101.
  252. Sommacal, H.M., et al., *Clinical impact of systematic nutritional care in adults submitted to allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Rev Bras Hematol Hemoter, 2012. **34**(5): p. 334-8.
  253. Rieger, C.T., et al., *Weight Loss and Decrease of Body Mass Index during Allogeneic Stem Cell Transplantation Are Common Events with Limited Clinical Impact.* PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145445.
  254. Ruiz-Delgado G.J., L.-P.J.A., Alarcon-Urdaneta C., Calderón-García J., Ruiz-Argüelles G.J., *Body mass index as an indicator of prognosis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation.* Rev Hematol Mex, 2011. **12**: p. 28-31.
  255. Hadjibabaie, M., et al., *The relationship between body mass index and outcomes in leukemic patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Clin Transplant, 2012. **26**(1): p. 149-55.
  256. Seguy, D., et al., *Better outcome of patients undergoing enteral tube feeding after myeloablative conditioning for allogeneic stem cell transplantation.* Transplantation, 2012. **94**(3): p. 287-94.
  257. Trifilio, S., et al., *Questioning the role of a neutropenic diet following hematopoietic stem cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2012. **18**(9): p. 1385-90.
  258. Baumgartner, A., et al., *Revisiting nutritional support for allogeneic hematologic stem cell transplantation-a systematic review.* Bone Marrow Transplant, 2017. **52**(4): p. 506-513.
  259. Flowers, M.E. et al. *Long-Term Follow-up after Hematopoietic Stem Cell Transplant. General Guidelines for Referring Physicians* (Fred Hutchinson Cancer Research Center/Seattle Cancer Care Alliance). Seattle, 2008.
  260. van der Meij, B.S., et al., *If the gut works, use it! But does the gut work in gastrointestinal GvHD?* Bone Marrow Transplant, 2017. **52**(3): p. 466-469.
  261. Svahn, B.M., et al., *Case-control comparison of at-home and hospital care for allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation: the role of oral nutrition.*



- Transplantation, 2008. **85**(7): p. 1000-7.
262. USNational Library of Medicine, *ClinicalTrials.gov*[online]. NIH [cit. 16.2. 2018]. Dostupné z <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01955772> (2016).
  263. Whangbo, J., J. Ritz, and A. Bhatt, *Antibiotic-mediated modification of the intestinal microbiome in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2017. **52**(2): p. 183-190.
  264. Storb, R., et al., *Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment*. N Engl J Med, 1983. **308**(6): p. 302-7.
  265. Simms-Waldrup, T.R., et al., *Antibiotic-Induced Depletion of Anti-inflammatory Clostridia Is Associated with the Development of Graft-versus-Host Disease in Pediatric Stem Cell Transplantation Patients*. Biol Blood Marrow Transplant, 2017. **23**(5): p. 820-829.
  266. Routy, B., et al., *The influence of gut-decontamination prophylactic antibiotics on acute graft-versus-host disease and survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Oncoimmunology, 2017. **6**(1): p. e1258506.
  267. Weber, D., et al., *Rifaximin preserves intestinal microbiota balance in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2016. **51**(8): p. 1087-92.
  268. Farowski, F., et al., *Impact of choice, timing, sequence and combination of broad-spectrum antibiotics on the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2018. **53**(1): p. 52-57.
  269. Shono, Y., et al., *Increased GVHD-related mortality with broad-spectrum antibiotic use after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in human patients and mice*. Sci Transl Med, 2016. **8**(339): p. 339ra71.
  270. Nishi, K., et al., *Impact of the Use and Type of Antibiotics on Acute Graft-versus-Host Disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2018. **24**(11): p. 2178-2183.
  271. Tavit, B., et al., *Pretransplant nutritional habits and clinical outcome in children undergoing hematopoietic stem cell transplant*. Exp Clin Transplant, 2012. **10**(1): p. 55-61.
  272. Lyama S., S.T., Tatsumi H., *Efficacy of enteral supplementattion enriched with glutamine, fiber, and oligosaccharide on mucosal injury following hematopoietic stem-cell transplantation*. Case Rep Oncol, 2014. **7**: p. 692-699.
  273. Gorshein, E., et al., *Lactobacillus rhamnosus GG probiotic enteric regimen does not appreciably alter the gut microbiome or provide protection against GVHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Clin Transplant, 2017. **31**(5).
  274. Sharma, A., et al., *Lactobacillus brevis CD2 lozenges prevent oral mucositis in patients undergoing high dose chemotherapy followed by haematopoietic stem cell transplantation*. ESMO Open, 2016. **1**(6): p. e000138.
  275. Pamer, E.G., Taur Y., Jenq R, *Impact of the intestinal microbiota on infections and survival following hematopoietic stem cell transplantation*. Blood, 2014. **124**.
  276. Taur, Y., et al., *Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant*. Sci Transl Med, 2018. **10**(460).
  277. Cammarota, G., et al., *European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice*. Gut, 2017. **66**(4): p. 569-580.
  278. DeFilipp, Z., et al., *Fecal Microbiota Transplantation: Restoring the Injured Microbiome after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation*. Biol Blood Marrow

- Transplant, 2019. **25**(1): p. e17-e22.
279. Shouval R., G.M., Nagler A., et al, *Fecal microbiota transplantation for treatment of acute graft -versus-host disease*. Clin Haematol Int, 2019. **1**: p. 28.
  280. Gagliardi, A., et al., *Rebuilding the Gut Microbiota Ecosystem*. Int J Environ Res Public Health, 2018. **15**(8).
  281. Vrieze, A., et al., *Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome*. Gastroenterology, 2012. **143**(4): p. 913-6 e7.
  282. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
  283. Garrett, W.S., et al., *Communicable ulcerative colitis induced by T-bet deficiency in the innate immune system*. Cell, 2007. **131**(1): p. 33-45.
  284. Kelly, C.R., et al., *Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook*. Gastroenterology, 2015. **149**(1): p. 223-37.
  285. Ramai, D., et al., *Fecal microbiota transplantation: donor relation, fresh or frozen, delivery methods, cost-effectiveness*. Ann Gastroenterol, 2019. **32**(1): p. 30-38.
  286. Jiang, Z.D., et al., *Safety and preliminary efficacy of orally administered lyophilized fecal microbiota product compared with frozen product given by enema for recurrent Clostridium difficile infection: A randomized clinical trial*. PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0205064.
  287. Bilinski, J., et al., *Fecal Microbiota Transplantation in Patients With Blood Disorders Inhibits Gut Colonization With Antibiotic-Resistant Bacteria: Results of a Prospective, Single-Center Study*. Clin Infect Dis, 2017. **65**(3): p. 364-370.
  288. Neemann, K., et al., *Fecal microbiota transplantation for fulminant Clostridium difficile infection in an allogeneic stem cell transplant patient*. Transpl Infect Dis, 2012. **14**(6): p. E161-5.
  289. de Castro, C.G., Jr., et al., *Fecal microbiota transplant after hematopoietic SCT: report of a successful case*. Bone Marrow Transplant, 2015. **50**(1): p. 145.
  290. Webb, B.J., et al., *Fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2016. **18**(4): p. 628-33.
  291. Kakihana, K., et al., *Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut*. Blood, 2016. **128**(16): p. 2083-2088.
  292. Spindelboeck, W., et al., *Repeated fecal microbiota transplantations attenuate diarrhea and lead to sustained changes in the fecal microbiota in acute, refractory gastrointestinal graft-versus-host-disease*. Haematologica, 2017. **102**(5): p. e210-e213.
  293. Qi, X., et al., *Treating Steroid Refractory Intestinal Acute Graft-vs.-Host Disease With Fecal Microbiota Transplantation: A Pilot Study*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2195.
  294. Wardill, H.R., et al., *Adjunctive fecal microbiota transplantation in supportive oncology: Emerging indications and considerations in immunocompromised patients*. EBioMedicine, 2019. **44**: p. 730-740.
  295. Dailey, F.E., et al., *The dirty aspects of fecal microbiota transplantation: a review of its adverse effects and complications*. Curr Opin Pharmacol, 2019. **49**: p. 29-33.
  296. Ott, S.J., et al., *Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With Clostridium difficile Infection*. Gastroenterology, 2017. **152**(4): p. 799-811 e7.

297. Rayes, A., et al., *A Genetic Modifier of the Gut Microbiome Influences the Risk of Graft-versus-Host Disease and Bacteremia After Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2016. **22**(3): p. 418-22.
298. Rouquier, S., et al., *Molecular cloning of a human genomic region containing the H blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene and two H locus-related DNA restriction fragments. Isolation of a candidate for the human Secretor blood group locus*. J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4632-9.
299. Hoskins, L.C., et al., *Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins*. J Clin Invest, 1985. **75**(3): p. 944-53.
300. Moulds, J.M., et al., *Human blood groups: incidental receptors for viruses and bacteria*. Transfusion, 1996. **36**(4): p. 362-74.
301. Kelly, R.J., et al., *Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group alpha(1,2)fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype*. J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4640-9.
302. Weber, D., et al., *Low urinary indoxyl sulfate levels early after transplantation reflect a disrupted microbiome and are associated with poor outcome*. Blood, 2015. **126**(14): p. 1723-8.
303. Koda Y., S.M., Kimura H., *The polymorphisms of fucosyl-transferases*. Leg Med, 2001. **3**: p. 2-14.
304. Fliegerova, K., et al., *Effect of DNA extraction and sample preservation method on rumen bacterial population*. Anaerobe, 2014. **29**: p. 80-4.
305. Rothberg, J.M., et al., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 348-52.
306. Bolyen E, R.J., Dillon MR, *Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2*. Nature Biotechnology, 2019. **37**: p. 852-857.
307. Yeh, T.C., et al., *Severe infections in children with acute leukemia undergoing intensive chemotherapy can successfully be prevented by ciprofloxacin, voriconazole, or micafungin prophylaxis*. Cancer, 2014. **120**(8): p. 1255-62.
308. Ingham, A.C., et al., *Specific gut microbiome members are associated with distinct immune markers in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Microbiome, 2019. **7**(1): p. 131.
309. van Vliet, M.J., et al., *The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis*. PLoS Pathog, 2010. **6**(5): p. e1000879.
310. Jaffe, D., et al., *Prevention of peritransplantation viridans streptococcal bacteremia with early vancomycin administration: a single-center observational cohort study*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(11): p. 1625-32.
311. Castagnola, E., et al., *Incidence of bacteremias and invasive mycoses in children undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center experience*. Bone Marrow Transplant, 2008. **41**(4): p. 339-47.
312. Almyroudis, N.G., et al., *Pre- and post-engraftment bloodstream infection rates and associated mortality in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients*. Transpl Infect Dis, 2005. **7**(1): p. 11-7.
313. Groos, S., G. Hunefeld, and L. Luciano, *Parenteral versus enteral nutrition: morphological changes in human adult intestinal mucosa*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1996. **28**(1): p. 61-74.

- 314. Pierre, J.F., *Gastrointestinal immune and microbiome changes during parenteral nutrition*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017. **312**(3): p. G246-G256.
- 315. Gibson, C.M., et al., *The alteration of the gut microbiome by immunosuppressive agents used in solid organ transplantation*. Transpl Infect Dis, 2020: p. e13397.
- 316. Flannigan, K.L., et al., *An intact microbiota is required for the gastrointestinal toxicity of the immunosuppressant mycophenolate mofetil*. J Heart Lung Transplant, 2018. **37**(9): p. 1047-1059.
- 317. Golob, J.L., et al., *Stool Microbiota at Neutrophil Recovery Is Predictive for Severe Acute Graft vs Host Disease After Hematopoietic Cell Transplantation*. Clin Infect Dis, 2017. **65**(12): p. 1984-1991.
- 318. Xian, P., et al., *The Oral Microbiome Bank of China*. Int J Oral Sci, 2018. **10**(2): p. 16.

## Seznam zkratek

AhR	aryl uhlovodíkový receptor
AIM2	(Absence in melanoma 2)
ALL	akutní lymfoblastová leukémie
alo-HSCT	alogenní transplantace zárodečných hematopoetických buněk
AML	akutní myeloidní leukémie
AMP	(antimicrobial peptides) antimikrobiální peptidy
ASPEN	(American Society for Parenteral and Enteral Nutrition) Americká společnost pro enterální a parenterální výživu
CDI	(Clostridium difficile infection)
cGAS	(cyclic GMP-AMP synthase)
CsA	ciclosporin A
DAMP	(Damage-Associated Molecular Patterns) molekulární vzory asociované s poškozením
DC	(dendritic cells) dendritické buňky
ELFO	elektroforéza
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
ESPEN	(European Society for Parenteral and Enteral Nutrition) Evropská společnost pro enterální a parenterální výživu
EV	enterální výživa
FMT	(Fecal Microbiota Transplantation) transplantace střevní mikrobioty
FOS	fruktooligosacharidy
FUT2	Fucosyltransferaza
FXF 19	(fibroblast growth factor 19) fibroblastový růstový faktor 19
FXR	(farnesoid X receptor) Farnesoidní X receptor
GCS-F	(granulocyte colony stimulating factor) faktor stimulující kolonie granulocytů
GIT	gastrointestinální trakt
GOS	galaktooligosacharidy
GVHD	(Graft-Versus-Host disease) reakce štěpu proti hostiteli
GvL	(Graft versus Leukemia) reakce štěpu proti leukémii
HDAC	(histone deacetylase inhibitor) inhibitory histon deacetylázy
HEV	(High endothelial venules) venuly s vysokým endotelem
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSCT	(Hematopoietic stem cell transplantation) transplantace hematopoetických kmenových buněk
IBD	(inflammatory bowel disease) nespecifické střevní záněty
IEC	(intestinal epithelial cell) střevní epitelové buňky
MAMP	(Microbe-Associated Molecular Patterns) s mikrobem asociované molekulární vzory
MHC	Major Histocompatibility complex
MMF	mykofenolátmofetil
NGS	(Next Generation Sequencing) sekvenování nové generace
NK	natural killer cells
NLRP-3	pyrinová doména obsahující protein 3
NOD	(NOD-like receptor)
OS	(overall survival) celkové přežití

PAMP	(Pathogen-Associated Molecular Patterns) s patogeny asociované molekulární vzory
PCR	polymerázová řetězová reakce
PRR	(Pattern recognition receptor) receptory rozeznávající molekulové vzory
PV	parenterální výživa
PXR	(pregnanový X receptor)
RIC	režim s redukovanou intenzitou
RIG-I	(Retinoic acid inducible gene I)
SCFA	(Short-chain fatty acids) mastné kyseliny s krátkým řetězcem
SNP	single nucleotid polymorphism
TcR	(T-cell receptor) T buněčný receptor
TGR 5	(transmembrane G protein-coupled receptor)
TLR	(Toll-like receptor)
TNF	tumor necrosis factor
TPN	(Total Parenteral Nutrition) celková parenterální výživa
Treg	T regulační buňky
TRM	(transplant related mortality) potransplantační mortalita

## Seznam tabulek a obrázků

### Seznam tabulek:

Tab. 1:	Fylogenetická distribuce lidských gastrointestinálních mikrobiálních fylogentypů .....	12
Tab. 2:	Metabolické vlastnosti členů lidské střevní mikrobioty .....	18
Tab. 3:	Složky PCR reakční směsi pro 1 vzorek .....	43
Tab. 4:	PCR program pro amplifikaci úseku V4 – V5 .....	43
Tab. 5:	Úprava konců DNA templátu. Složky reakční směsi pro 1 vzorek .....	46
Tab. 6:	Připojení adaptorů. Složky reakční směsi pro 1 vzorek .....	46
Tab. 7:	Reakční směs pro amplifikaci 1 vzorku .....	47
Tab. 8:	Složky reakční směsi pro jeden vzorek. DNA poměr ředění (1:5000) .....	48
Tab. 9:	Koncentrace standardů KAPA .....	48
Tab. 10:	Reakční podmínky pro qPCR reakci .....	48
Tab. 11:	Reakční složky pro přípravu amplifikačního roztoku .....	51
Tab. 12:	Reakční složky pro přípravu Melt-Off Solution .....	52
Tab. 13:	Schéma pro naplnění jamek stripu 1-8 .....	52

### Seznam obrázků:

Obr. 1:	Ion One Touch™2 (Thermo Fisher Scientific) .....	50
Obr. 2:	Umístění Recovery Tubes a Recovery Router do centrifugy .....	50
Obr. 3:	Reakční filtr .....	51
Obr. 4:	Strip 1-8 jamek OneTouch™ .....	52
Obr. 5:	Příprava držáku ramene Ion OneTouch™ ES .....	53
Obr. 6:	Ion PGM™ HI-Q™ .....	53
Obr. 7:	Aplikace ISPs částic na Ion chip™ .....	54
Obr. 8:	Odsátí tekutiny z portu Ion čipu (Chip™) .....	54
Obr. 9:	Parametry reakce NGS .....	56
Obr. 10:	Vzorky střevní mikrobioty u pacientů před B (before) a po A (after) alo-HSCT zhodnoceny metodou PCoA .....	57
Obr. 11:	Krabicový graf rovnoměrnosti mikrobiální diversity (Pielou evenness index). Skupina A (after) a B (before) alo-HSCT .....	58
Obr. 12:	Krabicový graf vyrovnanosti mikrobiální diversity (Shannon-Wiener index). Skupina A (after), B (before) alo-HSCT .....	58
Obr. 13:	Krabicový graf fylogenetické diversity PD (Faith index). Skupina A (after), B (before) alo-HSCT .....	59
Obr. 14:	Grafické znázornění taxonomických jednotek mikroorganismů střevní mikrobioty u pacientů s alo-HSCT. Sloupec A (po transplantaci), sloupec B (před transplantací)...	60
Obr. 15:	Grafické znázornění taxonomických jednotek mikroorganismů v mikrobiotě se zkrácenou legendou, sloupec A (po transplantaci), sloupec B (před transplantací)...	61

## Přílohy

### PŘÍLOHA 1. Tabulka s údaji pacientů v experimentu

číslo izolace	antibiotická profylaxe	kondicionování	PV	PV trvání	BMI	Relaps	GVHD	úmrtí	Before/after
1	YES	nemyeloablativní	NO	ND	21,46	NO	NO	NO	Before
2	YES	nemyeloablativní	NO	ND	23,81	NO	NO	NO	After
3	YES	myeloablativní	NO	ND	19,27	NO	NO	NO	After
4	YES	nemyeloablativní	NO	ND	27,51	YES	NO	NO	After
5	YES	nemyeloablativní	NO	ND	38,20	NO	NO	NO	After
6	YES	nemyeloablativní	NO	ND	38,20	NO	NO	NO	Before
7	YES	myeloablativní	PV	4	24,68	NO	NO	NO	Before
8	YES	myeloablativní	PV	5	24,07	NO	NO	NO	Before
9	YES	myeloablativní	PV	5	24,07	NO	NO	NO	After
11	YES	myeloablativní	PV	4	24,68	NO	NO	NO	After
13	YES	myeloablativní	PV	7	24,09	NO	NO	NO	After
14	YES	myeloablativní	NO	ND	19,95	NO	NO	NO	After
15	YES	myeloablativní	PV	3	22,49	NO	NO	NO	After
16	YES	nemyeloablativní	PV	6	21,91	NO	NO	NO	Before
17	NO	myeloablativní	ND	ND	24,69	NO	NO	NO	Before
18	YES	myeloablativní	PV	3	22,49	NO	NO	NO	Before
19	YES	nemyeloablativní	PV	6	21,91	NO	NO	NO	After
21	NO	myeloablativní	ND	ND	24,69	NO	NO	NO	Before
22	NO	myeloablativní	ND	ND	24,69	NO	NO	NO	After
23	YES	myeloablativní	PV	11	25,73	NO	NO	NO	Before
24	YES	nemyeloablativní	NO	ND	23,81	NO	NO	NO	Before
25	YES	myeloablativní	PV	20	19,71	YES	NO	YES	After
26	NO	nemyeloablativní	PV	5	23,12	NO	NO	NO	Before
28	NO	nemyeloablativní	PV	5	23,12	NO	NO	NO	After
29	YES	myeloablativní	PV	3	34,80	YES	NO	NO	After
30	YES	myeloablativní	PV	7	24,09	NO	NO	NO	Before
31	YES	nemyeloablativní	NO	ND	26,54	NO	NO	NO	Before
32	YES	myeloablativní	NO	ND	19,27	NO	NO	NO	Before
33	YES	myeloablativní	PV	20	19,71	YES	NO	YES	Before
35	YES	myeloablativní	PV	11	25,73	NO	NO	NO	After
36	YES	myeloablativní	PV	9	24,86	NO	NO	NO	After
37	YES	myeloablativní	NO	ND	29,39	YES	NO	NO	After
38	YES	myeloablativní	PV	9	24,86	NO	NO	NO	Before
40	YES	myeloablativní	NO	ND	19,95	NO	NO	NO	Before
41	YES	myeloablativní	PV	3	34,80	YES	NO	NO	Before
42	YES	myeloablativní	NO	ND	29,39	YES	NO	NO	Before



43	YES	nemyeloablativní	NO	ND	27,51	YES	NO	NO	Before
45	YES	nemyeloablativní	NO	ND	26,54	NO	NO	NO	After
49	YES	myeloablativní	PV	5	21,22	YES	NO	NO	Before
50	YES	myeloablativní	PV	5	31,07	NO	NO	NO	Before
51	NO	nemyeloablativní	PV	10	25,62	NO	NO	NO	After
52	YES	nemyeloablativní	NO	ND	21,46	NO	NO	NO	After
53	YES	myeloablativní	PV	7	22,88	YES	NO	NO	Before
54	NO	nemyeloablativní	PV	10	25,62	NO	NO	NO	Before
55	YES	nemyeloablativní	NO	ND	28,73	NO	NO	NO	Before
56	YES	myeloablativní	PV	6	22,62	NO	NO	NO	Before
57	YES	myeloablativní	PV	6	30,12	NO	NO	NO	Before
59	YES	nemyeloablativní	NO	ND	23,42	YES	NO	NO	Before
60	YES	myeloablativní	PV	7	22,88	YES	NO	NO	After
61	YES	nemyeloablativní	NO	ND	23,42	YES	NO	NO	After
62	YES	myeloablativní	NO	ND	28,14	NO	NO	NO	Before
64	YES	myeloablativní	PV	5	21,22	YES	NO	NO	After
65	YES	nemyeloablativní	NO	ND	29,71	NO	NO	NO	After
66	YES	myeloablativní	PV	30	27,13	NO	NO	NO	Before
67	YES	myeloablativní	PV	6	25,08	NO	NO	NO	Before
68	YES	myeloablativní	PV	6	22,62	NO	NO	NO	After
69	NO	nemyeloablativní	NO	ND	26,67	NO	YES	NO	After
70	YES	nemyeloablativní	NO	ND	20,13	NO	NO	YES	After
71	YES	nemyeloablativní	NO	ND	23,70	YES	NO	NO	After
72	YES	myeloablativní	PV	4	39,67	YES	NO	YES	Before
73	YES	myeloablativní	PV	4	39,67	YES	NO	YES	After
74	YES	myeloablativní	PV	6	25,08	NO	NO	NO	After
76	YES	myeloablativní	PV	4	20,06	NO	NO	NO	After
77	YES	nemyeloablativní	NO	ND	28,73	NO	NO	NO	After
78	YES	myeloablativní	PV	6	30,12	NO	NO	NO	After
79	YES	nemyeloablativní	PV	6	20,45	NO	NO	NO	Before
80	YES	myeloablativní	PV	10	24,39	NO	NO	NO	After
81	YES	nemyeloablativní	PV	6	20,45	NO	NO	NO	After
82	NO	nemyeloablativní	NO	ND	26,67	NO	YES	NO	Before
83	YES	nemyeloablativní	NO	ND	29,71	NO	NO	NO	Before
84	YES	nemyeloablativní	NO	ND	28,41	YES	NO	NO	Before
85	YES	nemyeloablativní	NO	ND	23,70	YES	NO	NO	Before
86	YES	nemyeloablativní	NO	ND	20,13	NO	NO	YES	Before
87	YES	myeloablativní	PV	5	31,07	NO	NO	NO	After
88	YES	myeloablativní	NO	ND	28,14	NO	NO	NO	After
89	YES	myeloablativní	PV	30	27,13	NO	NO	NO	After
90	YES	nemyeloablativní	NO	ND	28,41	YES	NO	NO	After
91	YES	myeloablativní	PV	4	20,06	NO	NO	NO	Before
92	YES	myeloablativní	PV	10	24,39	NO	NO	NO	Before

## PŘÍLOHA 2. Podrobné výsledky z detailního hodnocení změn mikrobioty

### Detailní hodnocení změny mikrobioty – vliv antibiotické profylaxe

index: doména (0); kmen (1); třída (2); řád (3); čeleď (4)	ANO (%)	NE (%)
D_0__Archaea;D_1__Euryarchaeota;D_2__Methanobacteria;D_3__Methanobacteriales;D_4__Methanobacteriaceae	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetaceae	0,46	3,23
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetales Incertae Sedis	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Bifidobacteriales;D_4__Bifidobacteriaceae	1,30	2,23
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Corynebacteriaceae	0,22	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Microbacteriaceae	0,06	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Micrococcaceae	0,31	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__Propionibacteriaceae	0,09	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Atopobiaceae	0,28	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriaceae	1,02	2,38
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,03	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Eggerthellaceae	0,93	0,61
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__uncultured	0,06	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacteroidaceae	7,81	8,06
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Barnesiellaceae	0,46	0,31
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Marinifilaceae	0,40	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Murielaceae	0,22	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porphyromonadaceae	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevotellaceae	0,96	0,61

D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Rikenellaceae	1,55	0,69
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Tannerellaceae	2,23	1,15
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__uncultured	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae	0,09	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Weeksellaceae	0,06	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia;D_2__Elusimicrobia;D_3__Elusimicrobiales;D_4__Elusimicrobiaceae	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacteriales;D_4__Campylobacteraceae	0,09	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacteriales;D_4__Helicobacteraceae	0,06	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family X	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XI	0,09	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Paenibacillaceae	0,09	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Planococcaceae	0,00	0,15
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae	0,25	3,46
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Aerococcaceae	0,06	0,15
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Carnobacteriaceae	0,06	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococcaceae	6,42	9,22
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae	1,92	1,15
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae	0,12	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae	2,88	10,29
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Christensenellaceae	1,55	0,31
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiaceae 1	1,43	1,08
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiales vadinBB60 group	0,46	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Defluviitaleaceae	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Eubacteriaceae	0,15	0,00

D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XI	<b>0,09</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XIII	<b>0,71</b>	<b>0,31</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Lachnospiraceae	<b>29,51</b>	<b>31,34</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptococcaceae	<b>0,15</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae	<b>1,49</b>	<b>2,15</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Ruminococcaceae	<b>13,42</b>	<b>12,83</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Erysipelotrichia;D_3__Erysipelotrichales;D_4__Erysipelotrichaceae	<b>1,12</b>	<b>1,61</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Acidaminococcaceae	<b>0,31</b>	<b>0,15</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae	<b>1,46</b>	<b>0,31</b>
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Lentisphaerae;D_2__Lentisphaeria;D_3__Victivallales;D_4__Victivallaceae	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Rhizobiaceae	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodospirillales;D_4__uncultured	<b>0,22</b>	<b>0,08</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rickettsiales;D_4__Mitochondria	<b>0,25</b>	<b>0,23</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfovibrionales;D_4__Desulfovibrionaceae	<b>0,31</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Aeromonadales;D_4__Aeromonadaceae	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae	<b>1,15</b>	<b>0,31</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae	<b>2,01</b>	<b>1,46</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pasteurellales;D_4__Pasteurellaceae	<b>0,22</b>	<b>0,08</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae	<b>0,03</b>	<b>0,08</b>

D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes;D_2__Synergistia;D_3__Synergistales;D_4__Synergistaceae	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Izimaplasmatales;D_4__uncultured organism	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes RF39;D_4__uncultured bacterium	<b>0,03</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Verrucomicrobiales;D_4__Akkermansiaceae	<b>0,22</b>	<b>0,15</b>
Unassigned;__;__;__;__	<b>12,46</b>	<b>3,53</b>

### Detailní hodnocení změny mikrobioty – vliv přípravného režimu

index: doména (0); kmen (1); třída (2); řád (3); čeleď (4)	myelo ablativ ní (%)	RIC (%)
D_0__Archaea;D_1__Euryarchaeota;D_2__Methanobacteria;D_3__Methanobacteriales; D_4__Methanobacteriaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__ _Actinomycetaceae	0,49	1,36
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__ _Actinomycetales Incertae Sedis	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Bifidobacteriales;D_4__ _Bifidobacteriaceae	1,29	1,89
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__ _Corynebacteriaceae	0,20	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__ _Nocardiaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__B ogoriellaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__M icrobacteriaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__M icrococcaceae	0,34	0,24
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__ _Propionibacteriaceae	0,11	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__ _Atopobiaceae	0,20	0,13
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__ _Coriobacteriaceae	1,10	2,17
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__ _Coriobacteriales Incertae Sedis	0,05	0,09
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__ _Eggerthellaceae	0,67	0,69
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__ uncultured	0,04	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacter oidaceae	10,71	13,25
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Barne siellaceae	0,25	0,41
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Marini filaceae	0,33	0,28
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Murib aculaceae	0,29	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porph yromonadaceae	0,02	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevot ellaceae	0,90	1,72

D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Rikenellaceae	<b>1,56</b>	<b>2,11</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Tannerellaceae	<b>3,91</b>	<b>1,70</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__uncultured	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae	<b>0,00</b>	<b>0,09</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Wecksellaceae	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Deferribacteres;D_2__Deferribacteres;D_3__Deferribacterales;D_4__Deferribacteraceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia;D_2__Elusimicrobia;D_3__Elusimicrobiales;D_4__Elusimicrobiaceae	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacteriales;D_4__Campylobacteraceae	<b>0,09</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacteriales;D_4__Helicobacteraceae	<b>0,07</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family X	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XI	<b>0,07</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Paenibacillaceae	<b>0,04</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Planococcaceae	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae	<b>0,16</b>	<b>1,16</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Aerococcaceae	<b>0,14</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Carnobacteriaceae	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococcaceae	<b>9,14</b>	<b>16,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae	<b>1,65</b>	<b>1,01</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae	<b>0,05</b>	<b>0,09</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae	<b>4,80</b>	<b>4,54</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Christensenellaceae	<b>1,27</b>	<b>0,54</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiaceae 1	<b>1,10</b>	<b>1,16</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiales vadinBB60 group	<b>0,31</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Defluviitaleaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Eubacteriaceae	<b>0,09</b>	<b>0,00</b>

D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XI	<b>0,14</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XIII	<b>0,51</b>	<b>0,43</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Lachnospiraceae	<b>26,15</b>	<b>23,86</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptococcaceae	<b>0,02</b>	<b>0,09</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae	<b>1,76</b>	<b>1,14</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Ruminococcaceae	<b>11,42</b>	<b>11,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__DTU014;D_4__uncultured bacterium	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Erysipelotrichia;D_3__Erysipelotrichales;D_4__Erysipelotrichaceae	<b>1,21</b>	<b>0,62</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Acidaminococcaceae	<b>0,20</b>	<b>0,19</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae	<b>1,27</b>	<b>0,82</b>
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae	<b>0,02</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Lentisphaerae;D_2__Lentisphaeria;D_3__Victivallales;D_4__Victivallaceae	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Beijerinckiaceae	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Rhizobiaceae	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodospirillales;D_4__uncultured	<b>0,13</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rickettsiales;D_4__Mitochondria	<b>0,14</b>	<b>0,11</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Bdellovibrionales;D_4__Bacteriovoraceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfovibrionales;D_4__Desulfovibrionaceae	<b>0,20</b>	<b>0,19</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Aeromonadales;D_4__Aeromonadaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae	<b>0,85</b>	<b>0,93</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Neisseriaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae	<b>3,20</b>	<b>2,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pasteurellales;D_4__Pasteurellaceae	<b>0,14</b>	<b>0,09</b>



D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae	<b>0,07</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes;D_2__Synergistia;D_3__Synergistales;D_4__Synergistaceae	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Izimaplasmatales;D_4__uncultured organism	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes Incertae Sedis;D_4__Unknown Family	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes RF39;D_4__uncultured bacterium	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Verrucomicrobiales;D_4__Akkermansiaceae	<b>0,05</b>	<b>0,77</b>
Unassigned;__;__;__;__	<b>10,30</b>	<b>6,28</b>

## Detailní hodnocení změny mikrobioty – vliv parenterální výživy

index: doména (0); kmen (1); třída (2); řád (3); čeleď (4)	ANO (%)	NE (%)
D_0__Archaea;D_1__Euryarchaeota;D_2__Methanobacteria;D_3__Methanobacteriales;D_4__Methanobacteriaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Acidobacteria;D_2__Blastocatellia (Subgroup 4);D_3__Blastocatellales;D_4__Blastocatellaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetaceae	0,37	1,46
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Bifidobacteriales;D_4__Bifidobacteriaceae	1,12	2,13
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Corynebacteriaceae	0,13	0,13
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Microbacteriaceae	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Micrococcaceae	0,19	0,54
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__Propionibacteriaceae	0,09	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Atopobiaceae	0,17	0,13
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriaceae	1,66	1,46
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,06	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Eggerthellaceae	0,61	0,69
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__uncultured	0,04	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacteroidaceae	12,33	11,82
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacteroidales Incertae Sedis	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Barnesiellaceae	0,30	0,42
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Marinifilaceae	0,34	0,21
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Muriabaculaceae	0,28	0,04
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porphyromonadaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevotellaceae	1,40	1,00

D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Rikenellaceae	<b>1,64</b>	<b>2,36</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Tannerellaceae	<b>4,32</b>	<b>1,55</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Cytophagales;D_4__Hymenobacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Weeksellaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Cyanobacteria;D_2__Oxyphotobacteria;D_3__Chloroplast;D_4__Betula pendula (European white birch)	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Deferribacteres;D_2__Deferribacteres;D_3__Deferribacterales;D_4__Deferribacteraceae	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia;D_2__Elusimicrobia;D_3__Elusimicrobiales;D_4__Elusimicrobiaceae	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Campylobacteraceae	<b>0,06</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Helicobacteraceae	<b>0,06</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae	<b>0,11</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family X	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XI	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Paenibacillaceae	<b>0,06</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Planococcaceae	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae	<b>0,19</b>	<b>1,09</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Aerococcaceae	<b>0,15</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Carnobacteriaceae	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococcaceae	<b>9,52</b>	<b>14,30</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae	<b>1,34</b>	<b>1,57</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae	<b>5,85</b>	<b>3,20</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Christensenellaceae	<b>1,02</b>	<b>0,73</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiaceae 1	<b>0,86</b>	<b>1,34</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiales vadinBB60 group	<b>0,30</b>	<b>0,13</b>

D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Defluviitaleaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Eubacteriaceae	<b>0,09</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XI	<b>0,15</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XIII	<b>0,41</b>	<b>0,48</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Lachnospiraceae	<b>26,20</b>	<b>23,44</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptococcaceae	<b>0,00</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae	<b>1,42</b>	<b>1,46</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Ruminococcaceae	<b>10,43</b>	<b>12,65</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__DTU014;D_4__uncultured bacterium	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Erysipelotrichia;D_3__Erysipelotrichales;D_4__Erysipelotrichaceae	<b>0,63</b>	<b>1,32</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Acidaminococcaceae	<b>0,22</b>	<b>0,25</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae	<b>1,23</b>	<b>0,75</b>
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae	<b>0,04</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Lentisphaerae;D_2__Lentisphaeria;D_3__Victivallales;D_4__Victivallaceae	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Beijerinckiaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Rhizobiaceae	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodospirillales;D_4__uncultured	<b>0,13</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rickettsiales;D_4__Mitochondria	<b>0,11</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfovibrionales;D_4__Desulfovibrionaceae	<b>0,20</b>	<b>0,21</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Aeromonadales;D_4__Aeromonadaceae	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae	<b>0,97</b>	<b>0,75</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae	<b>3,41</b>	<b>1,90</b>

D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pasteurellales;D_4__Pasteurellaceae	<b>0,13</b>	<b>0,10</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae	<b>0,06</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae	<b>0,06</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes;D_2__Synergistia;D_3__Synergistales;D_4__Synergistaceae	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Izimaplasmatales;D_4__uncultured organism	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes Incertae Sedis;D_4__Unknown Family	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes RF39;D_4__uncultured bacterium	<b>0,04</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Verrucomicrobiales;D_4__Akkermansiaceae	<b>0,06</b>	<b>0,75</b>
Unassigned;__;__;__;__	<b>8,87</b>	<b>8,47</b>

## Detailní hodnocení změny mikrobioty – přítomnost relapsu

index: doména (0); kmen (1); třída (2); řád (3); čeleď (4)	ANO (%)	NE (%)
D_0__Archaea;D_1__Euryarchaeota;D_2__Methanobacteria;D_3__Methanobacteriales;D_4__Methanobacteriaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetaceae	0,53	0,87
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetales Incertae Sedis	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Bifidobacteriales;D_4__Bifidobacteriaceae	1,18	1,56
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Corynebacteriaceae	0,24	0,10
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Nocardiaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Bogoriellaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Microbacteriaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Micrococcaceae	0,27	0,33
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__Propionibacteriaceae	0,00	0,10
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Atopobiaceae	0,05	0,21
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriaceae	0,96	1,57
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,00	0,09
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Eggerthellaceae	0,48	0,77
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__uncultured	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacteroidaceae	12,68	10,97
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Barnesiellaceae	0,39	0,27
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Marianifilaceae	0,46	0,24
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Muriabaculaceae	0,02	0,27
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porphyromonadaceae	0,00	0,03

D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevotellaceae	<b>0,43</b>	<b>1,35</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Rikenellaceae	<b>2,80</b>	<b>1,47</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Tannerellaceae	<b>5,57</b>	<b>2,50</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__uncultured	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Weeksellaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Deferribacteres;D_2__Deferribacteres;D_3__Deferribacterales;D_4__Deferribacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia;D_2__Elusimicrobia;D_3__Elusimicrobiales;D_4__Elusimicrobiaceae	<b>0,05</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Campylobacteraceae	<b>0,05</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Helicobacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family X	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XI	<b>0,02</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Paenibacillaceae	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Planococcaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae	<b>0,07</b>	<b>0,56</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Aerococcaceae	<b>0,34</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Carnobacteriaceae	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococcaceae	<b>19,19</b>	<b>9,31</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae	<b>1,33</b>	<b>1,44</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae	<b>3,25</b>	<b>4,90</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Christensenellaceae	<b>0,43</b>	<b>1,23</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiaceae 1	<b>1,18</b>	<b>1,18</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiales vadinBB60 group	<b>0,14</b>	<b>0,27</b>

D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Defluviitaleaceae	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Eubacteriaceae	<b>0,02</b>	<b>0,09</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XI	<b>0,05</b>	<b>0,12</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XIII	<b>0,34</b>	<b>0,53</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Lachnospiraceae	<b>20,90</b>	<b>26,51</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptococcaceae	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae	<b>1,57</b>	<b>1,52</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Ruminococcaceae	<b>8,41</b>	<b>11,85</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__DTU014;D_4__uncultured bacterium	<b>0,02</b>	<b>0,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Erysipelotrichia;D_3__Erysipelotrichales;D_4__Erysipelotrichaceae	<b>0,46</b>	<b>1,15</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Acidaminococcaceae	<b>0,39</b>	<b>0,17</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae	<b>0,94</b>	<b>1,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae	<b>0,02</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Lentisphaerae;D_2__Lentisphaeria;D_3__Victivallales;D_4__Victivallaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Beijerinckiaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Rhizobiaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodospirillales;D_4__uncultured	<b>0,10</b>	<b>0,10</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rickettsiales;D_4__Mitochondria	<b>0,07</b>	<b>0,12</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Bdellovibrionales;D_4__Bacteriovoracaceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfovibrionales;D_4__Desulfovibrionaceae	<b>0,53</b>	<b>0,15</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Aeromonadales;D_4__Aeromonadaceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae	<b>0,34</b>	<b>1,03</b>



D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Neisseriaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae	6,89	1,80
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pasteurellales;D_4__Pasteurellaceae	0,05	0,14
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae	0,00	0,07
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae	0,00	0,05
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes;D_2__Synergistia;D_3__Synergistales;D_4__Synergistaceae	0,05	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Izimaplasmatales;D_4__uncultured organism	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes Incertae Sedis;D_4__Unknown Family	0,02	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes RF39;D_4__uncultured bacterium	0,02	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Verrucomicrobiales;D_4__Akkermansiaceae	0,02	0,38
Unassigned;__;__;__;__	6,44	10,37

## Detailní hodnocení změny mikrobioty – přítomnost úmrtí

index: doména (0); kmen (1); třída (2); řád (3); čeleď (4)	ANO (%)	NE (%)
D_0__Archaea;D_1__Euryarchaeota;D_2__Methanobacteria;D_3__Methanobacteriales;D_4__Methanobacteriaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetaceae	0,46	0,79
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetales Incertae Sedis	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Bifidobacteriales;D_4__Bifidobacteriaceae	3,72	1,35
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Corynebacteriaceae	0,00	0,16
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Nocardiaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Bogoriellaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Microbacteriaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Micrococcaceae	0,27	0,33
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__Propionibacteriaceae	0,00	0,10
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Atopobiaceae	0,08	0,20
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriaceae	2,60	1,32
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,00	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Eggerthellaceae	0,32	0,77
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__uncultured	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacteroidaceae	8,97	10,73
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Barnesiellaceae	0,64	0,30
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Marianifilaceae	0,27	0,31
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Muriabaculaceae	0,00	0,28
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porphyromonadaceae	0,00	0,03

D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevotellaceae	<b>0,48</b>	<b>1,20</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Rikenellaceae	<b>2,17</b>	<b>1,65</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Tannerellaceae	<b>4,61</b>	<b>2,82</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__uncultured	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Weeksellaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Deferribacteres;D_2__Deferribacteres;D_3__Deferribacterales;D_4__Deferribacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia;D_2__Elusimicrobia;D_3__Elusimicrobiales;D_4__Elusimicrobiaceae	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Campylobacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Helicobacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family X	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XI	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Paenibacillaceae	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Planococcaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae	<b>0,05</b>	<b>0,46</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Aerococcaceae	<b>0,96</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Carnobacteriaceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococcaceae	<b>16,31</b>	<b>10,04</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae	<b>1,42</b>	<b>1,45</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae	<b>0,00</b>	<b>0,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae	<b>6,56</b>	<b>4,24</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Christensenellaceae	<b>0,54</b>	<b>1,22</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiaceae 1	<b>0,70</b>	<b>1,17</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiales vadinBB60 group	<b>0,03</b>	<b>0,31</b>

D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Defluviitaleaceae	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Eubacteriaceae	<b>0,03</b>	<b>0,08</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XI	<b>0,00</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XIII	<b>0,35</b>	<b>0,53</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Lachnospiraceae	<b>22,14</b>	<b>25,86</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptococcaceae	<b>0,00</b>	<b>0,08</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae	<b>1,34</b>	<b>1,47</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Ruminococcaceae	<b>10,82</b>	<b>11,55</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__DTU014;D_4__uncultured bacterium	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Erysipelotrichia;D_3__Erysipelotrichales;D_4__Erysipelotrichaceae	<b>0,24</b>	<b>1,07</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Acidaminococcaceae	<b>0,00</b>	<b>0,21</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae	<b>1,23</b>	<b>1,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Lentisphaerae;D_2__Lentisphaeria;D_3__Victivallales;D_4__Victivallaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Beijerinckiaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Rhizobiaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodospirillales;D_4__uncultured	<b>0,08</b>	<b>0,12</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rickettsiales;D_4__Mitochondria	<b>0,05</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Bdellovibrionales;D_4__Bacteriovoracaceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfovibrionales;D_4__Desulfovibrionaceae	<b>0,27</b>	<b>0,21</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Aeromonadales;D_4__Aeromonadaceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae	<b>0,37</b>	<b>0,94</b>

D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Neisseriaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae	6,64	2,37
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pasteurellales;D_4__Pasteurellaceae	0,03	0,13
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae	0,00	0,07
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae	0,00	0,05
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes;D_2__Synergistia;D_3__Synergistales;D_4__Synergistaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Izimaplasmatales;D_4__uncultured organism	0,03	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes Incertae Sedis;D_4__Unknown Family	0,03	0,00
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes RF39;D_4__uncultured bacterium	0,00	0,05
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Verrucomicrobiales;D_4__Akkermansiaceae	0,03	0,33
Unassigned;__;__;__;__	5,06	11,11

# Detailní hodnocení změny mikrobioty – přítomnost GVHD

index: doména (0); kmen (1); třída (2); řád (3); čeleď (4)	ANO (%)	NE (%)
D_0__Archaea;D_1__Euryarchaeota;D_2__Methanobacteria;D_3__Methanobacteriales;D_4__Methanobacteriaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetaceae	17,17	0,53
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Actinomycetales;D_4__Actinomycetales Incertae Sedis	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Bifidobacteriales;D_4__Bifidobacteriaceae	3,59	1,40
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Corynebacteriaceae	0,00	0,16
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Corynebacteriales;D_4__Nocardiaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Bogoriellaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Microbacteriaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Micrococcales;D_4__Micrococcaceae	0,03	0,32
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Actinobacteria;D_3__Propionibacteriales;D_4__Propionibacteriaceae	0,00	0,10
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Atopobiaceae	0,00	0,22
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriaceae	2,44	1,32
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Coriobacteriales Incertae Sedis	0,00	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__Eggerthellaceae	0,18	0,78
D_0__Bacteria;D_1__Actinobacteria;D_2__Coriobacteriia;D_3__Coriobacteriales;D_4__uncultured	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Bacteroidaceae	4,49	10,25
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Barnesiellaceae	0,12	0,32
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Marianifilaceae	0,09	0,33
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Muriabaculaceae	0,00	0,27
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Porphyromonadaceae	0,00	0,03

D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Prevotellaceae	<b>0,36</b>	<b>1,10</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Rikenellaceae	<b>0,24</b>	<b>1,66</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__Tannerellaceae	<b>1,19</b>	<b>2,87</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Bacteroidales;D_4__uncultured	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Flavobacteriaceae	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Bacteroidetes;D_2__Bacteroidia;D_3__Flavobacteriales;D_4__Weeksellaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Deferribacteres;D_2__Deferribacteres;D_3__Deferribacterales;D_4__Deferribacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Elusimicrobia;D_2__Elusimicrobia;D_3__Elusimicrobiales;D_4__Elusimicrobiaceae	<b>0,00</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Campylobacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Epsilonbacteraeota;D_2__Campylobacteria;D_3__Campylobacterales;D_4__Helicobacteraceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Bacillaceae	<b>0,00</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family X	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Family XI	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Paenibacillaceae	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Planococcaceae	<b>0,21</b>	<b>0,02</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Bacillales;D_4__Staphylococcaceae	<b>21,00</b>	<b>0,13</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Aerococcaceae	<b>0,00</b>	<b>0,10</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Carnobacteriaceae	<b>0,00</b>	<b>0,03</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Enterococcaceae	<b>0,09</b>	<b>10,00</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Lactobacillaceae	<b>1,60</b>	<b>1,45</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Leuconostocaceae	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae	<b>7,16</b>	<b>4,19</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Christensenellaceae	<b>0,36</b>	<b>1,26</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiaceae 1	<b>0,71</b>	<b>1,16</b>
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Clostridiales vadinBB60 group	<b>0,00</b>	<b>0,30</b>

D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Defluviitaleaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Eubacteriaceae	0,00	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XI	0,00	0,13
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Family XIII	0,06	0,49
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Lachnospiraceae	24,57	25,84
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptococcaceae	0,06	0,08
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Peptostreptococcaceae	0,56	1,45
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__Clostridiales;D_4__Ruminococcaceae	8,08	11,62
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Clostridia;D_3__DTU014;D_4__uncultured bacterium	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Erysipelotrichia;D_3__Erysipelotrichales;D_4__Erysipelotrichaceae	1,25	0,96
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Acidaminococcaceae	0,00	0,21
D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Negativicutes;D_3__Selenomonadales;D_4__Veillonellaceae	0,03	1,23
D_0__Bacteria;D_1__Fusobacteria;D_2__Fusobacteriia;D_3__Fusobacteriales;D_4__Fusobacteriaceae	0,00	0,05
D_0__Bacteria;D_1__Lentisphaerae;D_2__Lentisphaeria;D_3__Victivallales;D_4__Victivallaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Beijerinckiaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Rhizobiaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhodospirillales;D_4__uncultured	0,00	0,14
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rickettsiales;D_4__Mitochondria	0,00	0,14
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Bdellovibrionales;D_4__Bacteriovoracaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Deltaproteobacteria;D_3__Desulfovibrionales;D_4__Desulfovibrionaceae	0,00	0,25
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Aeromonadales;D_4__Aeromonadaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Burkholderiaceae	0,09	0,96



D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Betaproteobacteriales;D_4__Neisseriaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Enterobacteriales;D_4__Enterobacteriaceae	0,09	2,52
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pasteurellales;D_4__Pasteurellaceae	0,09	0,14
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Moraxellaceae	0,00	0,06
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Xanthomonadales;D_4__Xanthomonadaceae	0,00	0,05
D_0__Bacteria;D_1__Synergistetes;D_2__Synergistia;D_3__Synergistales;D_4__Synergistaceae	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Izimaplasmatales;D_4__uncultured organism	0,00	0,03
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes Incertae Sedis;D_4__Unknown Family	0,00	0,02
D_0__Bacteria;D_1__Tenericutes;D_2__Mollicutes;D_3__Mollicutes RF39;D_4__uncultured bacterium	0,00	0,05
D_0__Bacteria;D_1__Verrucomicrobia;D_2__Verrucomicrobiae;D_3__Verrucomicrobiales;D_4__Akkermansiaceae	0,77	0,30
Unassigned;__;__;__;__	3,30	11,91